

**Proteinbiochemische, spektroskopische und
röntgenkristallographische Untersuchung der
Actinobakteriellen [NiFe]-Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Caspar Schäfer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Bärbel Friedrich
 2. Prof. Dr. Holger Dobbek
 3. Prof. Dr. Gary Sawers

Tag der Einreichung: 17.02.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2014

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich am Institut für Biologie/Mikrobiologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Untersuchungen wurden aus Mitteln des Projektes „Design natürlicher Systeme zur lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Schäfer, C., Friedrich, B., & Lenz, O. (2013). Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5137-5145.

Zusammenfassung

Im biogeochemischen Wasserstoffkreislauf erfolgt der überwiegende Teil der H_2 -Aufnahme aus der Atmosphäre durch die Böden. Erst seit kurzem ist bekannt, dass die H_2 -Oxidation in Böden mutmaßlich durch eine Reihe von Bodenbakterien vermittelt wird, die zur Aufnahme von Wasserstoff in atmosphärischen Konzentrationen befähigt sind. Diese Bakterien codieren [NiFe]-Hydrogenasen einer neuen Gruppe, die als Gruppe 5 der [NiFe]-Hydrogenasen klassifiziert wurde. Auch das β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* besitzt die Gene einer derartigen Hydrogenase, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den sonst überwiegend in Actinobakterien gefundenen Vertretern der Gruppe 5 als „Actinobakterielle Hydrogenase“ (AH) benannt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die AH aus *R. eutropha* als erste Gruppe 5-[NiFe]-Hydrogenase in reiner Form aus dem Wirtsorganismus isoliert und eingehend durch unterschiedliche biochemische, spektroskopische und röntgenkristallographische Verfahren untersucht. Die Reinigung der AH erfolgte aus den löslichen Zellfraktionen mittels *Strep-Tactin*-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität des Enzyms. Die AH kann allein kein lithoautotrophes Wachstum vermitteln, da sie unter normalen Wachstumsbedingungen nur in geringen Mengen produziert wird und zudem eine sehr geringe H_2 -Oxidationsaktivität zeigt. Da im Gegensatz zur regulatorischen Hydrogenase (RH) aus *R. eutropha* für die AH jedoch eine Kopplung der Hydrogenaseaktivität mit der aeroben Atmungskette nachgewiesen werden konnte, ist eine energiekonservierende Funktion der AH sehr wahrscheinlich. Die Aktivität der Gruppe 5-Hydrogenase aus *Streptomyces* str. PCB7 wurde nur in Sporen gefunden (Constant *et al.*, 2008), daher wird auch für die AH aus *R. eutropha* eine Rolle im Erhaltungsstoffwechsel unter besonderen Bedingungen angenommen.

Konsistent hierzu wurde für die AH eine große Thermo- und pH-Toleranz gefunden; die AH ist aber im Gegensatz zu anderen Gruppe 5-Hydrogenasen offenbar nicht zur hochaffinen Aufnahme atmosphärischen Wasserstoffs befähigt. Die AH ist jedoch Sauerstoff-insensitiv, kann also auch in Gegenwart von Sauerstoff unvermindert Katalyse betreiben. Vorläufige FTIR-spektroskopische Untersuchungen an der AH lassen vermuten, dass während des katalytischen Zyklus kein Zustand auftritt, bei dem Sauerstoff im aktiven Zentrum bindet.

Die AH besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, HofG und HofK, die im nativen Zustand als Dimer dieses Heterodimers vorkommen. In der Kristallstruktur wurde eine sehr starke Interaktion der beiden Heterodimere mittels der C- und N-Termini der kleinen Untereinheiten beobachtet. Jedes Heterodimer besitzt ein [NiFe]-Zentrum in der großen und drei [4Fe4S]-Cluster in der kleinen Untereinheit, die zusammen eine Elektronentransportkette bilden. Aufgrund der Anordnung der Heterodimere zueinander ist eine Wechselwirkung der Elektronentransportketten beider Heterodimere wahrscheinlich. Der [4Fe4S]-Cluster proximal zum [NiFe]-Zentrum ist dabei durch drei Cysteine und ein Aspartat koordiniert, was in [NiFe]-Hydrogenasen bislang nicht beobachtet wurde. Austausch dieses Aspartats gegen eine Reihe anderer Aminosäuren deuten laut den Ergebnissen dieser Arbeit auf einen Einfluss dieser Position auf die Sauerstofftoleranz der AH hin.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der biogeochemische Wasserstoffkreislauf und die Bedeutung der Hydrogenase-vermittelten mikrobiellen H ₂ -Aufnahme	1
1.2 Bedeutung und Klassifizierung von Hydrogenasen	1
1.2.1 Strukturelle und funktionelle Vielfalt von Hydrogenasen.....	1
1.2.2 Hydrogenasen werden in drei Klassen eingeteilt.....	2
1.2.3 [FeFe]-Hydrogenasen	3
1.2.4 Katalytische Eigenschaften und Klassifizierung von [NiFe]-Hydrogenasen	3
1.3 Putativ hochaffine Hydrogenasen bilden eine eigene Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen	5
1.4 Wasserstoffmetabolismus und Hydrogenasen in <i>Ralstonia eutropha</i>	7
1.4.1 Metabolische Flexibilität von <i>R. eutropha</i>	7
1.4.2 Hydrogenasen in <i>R. eutropha</i>	8
1.4.3 Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen in <i>R. eutropha</i>	9
1.4.4 Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen	10
1.4.5 Genetische Organisation der Hydrogenasen	11
1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit.....	12
2 MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	14
2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	14
2.3 Behandlung von Geräten und Lösungen.....	18
2.4 Kultivierung von Bakterien.....	18
2.4.1 Nährmedien.....	18
2.4.2 Bestimmung des Zellwachstums	20
2.4.3 Zellkultivierung.....	20
2.4.4 Zellernte	20
2.4.5 Konservierung von Bakterienstämmen.....	20
2.5 Zellfraktionierung und Proteinreinigung	21
2.5.1 Präparation des Rohextrakts, der löslichen Fraktion und der Membranfraktion.....	21

2.5.2	Affinitätschromatographie.....	21
2.5.3	Isolation des AH _{Strep} -Proteins ohne verbleibende Nukleotide	22
2.5.4	Anionenaustauschchromatographie.....	22
2.6	Probenanalytik.....	22
2.6.1	Proteinbestimmung nach der BCA-Methode.....	22
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.6.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot und Antikörperfärbung.....	23
2.6.4	Aufnahme von UV/Vis-Absorptionsspektren.....	23
2.6.5	Größenbestimmung durch Gelpermeationschromatographie	23
2.6.6	Metallbestimmung.....	24
2.7	Bestimmung der Genexpression mittels RT-qPCR.....	24
2.7.1	RNA-Isolierung und Qualitätsanalyse.....	24
2.7.2	In-vitro Transkription	24
2.7.3	Reverse-Transkriptase-Reaktion	25
2.7.4	Real-Time- quantitative PCR (RT-qPCR)	25
2.8	Messung der Hydrogenaseaktivität.....	25
2.8.1	Gaschromatographie mit lebenden Zellen.....	25
2.8.2	CN-PAGE mit anschließender Hydrogenase-Aktivitätsfärbung.....	26
2.8.3	Spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung.....	26
2.8.4	Amperometrische Aktivitätsbestimmung	26
2.9	Spektroskopie	27
2.9.1	Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie.....	27
2.9.2	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR)-Spektroskopie.....	27
2.10	Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung von Proteinen.....	28
2.10.1	Kristallisation der AH.....	28
2.10.2	Röntgenstrukturbestimmung der AH.....	28
2.11	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.11.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.11.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.11.3	Restriktionsverdau von DNA	30
2.11.4	Dephosphorylierung von DNA.....	30
2.11.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.11.6	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.11.7	InFusion Rekombination	31

2.11.8	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.11.9	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.11.10	Sequenzierung.....	32
2.12	Plasmidtransfer.....	32
2.12.1	Herstellung chemokompetenter Zellen für die Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.12.2	Transformation durch Hitzeschock	32
2.12.3	Herstellung elektrokompeter Zellen.....	32
2.12.4	Transformation durch Elektroporation.....	33
2.12.5	Konjugation	33
2.12.6	Doppelte homologe Rekombination.....	33
2.13	Gentechnische Konstruktionen.....	33
2.13.1	Austausch des nativen Promoters des AH-Operons gegen den Promoter des MBH-Operons.....	33
2.13.2	Deletion der großen Untereinheit der AH	34
2.13.3	Deletion beider AH-Untereinheiten	34
2.13.4	Konstruktion einer HofK _{strep} -Variante der AH	34
2.13.5	Konstruktion einer unter der Kontrolle des SH-Promoters stehenden, auf einem Plasmid codierten _{strep} HofK-Variante der AH	35
2.13.6	Konstruktion von Stämmen zur heterologen Produktion von Hydrogenasen aus <i>S. avermitilis</i> und <i>M. smegmatis</i> in <i>R. eutropha</i>	35
2.13.7	Darstellung von Mutationen des Aspartats am proximalen [FeS]-Cluster der AH	35
2.14	Dokumentation und Datenverarbeitung	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	In <i>Ralstonia eutropha</i> wird funktionale „Actinobakterielle Hydrogenase“ (AH) gebildet, deren Aktivität sich <i>in-vivo</i> und in Zellextrakten nachweisen lässt.....	37
3.1.1	Mittels Gaschromatographie kann die AH-vermittelte H ₂ -Aufnahme lebender Zellen nachgewiesen werden.....	37
3.1.2	Die AH kann in nativen Gelen aufgetrennt und durch Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht werden	38
3.2	Untersuchungen zur physiologischen Rolle der AH in <i>R. eutropha</i>	39
3.2.1	Die Genexpression der AH ist unter Standardbedingungen nachweisbar, liegt aber auf niedrigem Niveau	39
3.2.2	AH-Genexpression unter verschiedenen Bedingungen	41
3.2.3	Aktivität der AH unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.....	44
3.2.4	Die AH kann durch die im eigenen Operon codierten Reifungsfaktoren vollständig maturiert werden, wird aber wahrscheinlich teilweise auch durch die im MBH- oder SH-Operon codierten Reifungsfaktoren maturiert.....	48

3.2.5	Die AH schleust Elektronen in die aerobe Atmungskette ein, aber kann kein lithoautotrophes Wachstum vermitteln	49
3.3	Reinigung der AH aus <i>R. eutropha</i>	53
3.3.1	Reinigung der AH aus dem Stamm <i>R. eutropha</i> HF901.....	53
3.3.2	Mit Hilfe eines optimierten Protokolls kann homogenes AH-Protein isoliert werden	55
3.3.3	Die Reinigung der AH mit Hilfe eines verbesserten Überexpressionssystems führt auch mit dem originalen Protokoll zu homogenem Protein	56
3.3.4	Im Zuge der AH-Reinigung werden Nukleotide cogereinigt, die sich auf verschiedene Arten abtrennen lassen	57
3.4	Untersuchungen zum Aufbau und den Metallcofaktoren der AH.....	62
3.4.1	Die AH besteht aus zwei Untereinheiten	62
3.4.2	Die AH kommt in einer Mischung aus monomerer und dimerer Form vor	62
3.4.3	Sequenzanalysen der AH sagen ein [NiFe]-Zentrum sowie drei [4Fe4S]-Cluster voraus.....	63
3.4.4	Die AH enthält die Metalle Nickel und Eisen.....	65
3.5	Aufklärung der atomaren Struktur der AH durch Kristallstrukturanalyse	66
3.5.1	Die AH lässt sich unter verschiedenen Bedingungen kristallisieren und bildet dabei bevorzugt nadelartige Kristalle	66
3.5.2	In der Kristallstruktur liegt die AH als Dimer vor und zeigt alle postulierten Metallzentren und -cofaktoren.....	68
3.5.3	Die AH besitzt drei [4Fe4S]-Cluster, wobei der proximale Cluster ein Aspartat als Liganden hat.....	70
3.6	Katalytische Parameter für den Umsatz von Wasserstoff durch die AH	73
3.6.1	Etablierung eines photometrischen Assays für die Bestimmung der AH-Aktivität.....	73
3.6.2	Für die Reaktion der AH mit NBT wurde eine Michaelis-Konstante von 7,8 μM bestimmt	76
3.6.3	Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_M) für die Reaktion der AH mit H_2 <i>in-vivo</i> und am gereinigten Enzym.....	77
3.6.4	Die AH erreicht ihre maximale katalytische Aktivität bei einer Temperatur von mindestens 80 °C.....	78
3.6.5	Die AH erreicht mit NBT als Akzeptor die maximale katalytische Aktivität bei pH 11...	79
3.6.6	Die AH zeigt hohe Stabilität unter verschiedenen Bedingungen	80
3.6.7	Die H_2 -Oxidationsaktivität der AH wird durch Sauerstoff nicht beeinflusst	82
3.7	Untersuchungen zum Redoxverhalten und katalytischen Zyklus der AH.....	84
3.7.1	Die Cofaktoren der AH sind EPR-inaktiv.....	84
3.7.2	IR-Spektroskopie an der AH deutet auf zwei interkonvertierbare Isoformen hin, die jeweils unterschiedliche Zustände besitzen.....	84

3.8	Der Austausch des Aspartats am proximalen Cluster durch andere Aminosäuren beeinträchtigt die O ₂ -Toleranz der AH.....	88
3.9	Heterologe Expression der Gruppe 5-Hydrogenasen aus <i>Streptomyces avermitilis</i> und <i>Mycobacterium smegmatis</i> in <i>Ralstonia eutropha</i>	91
3.9.1	Die Gruppe 5-Hydrogenase aus <i>Streptomyces str.</i> PCB7 unterscheidet sich in ihren Eigenschaften von der AH	91
3.9.2	Versuche zur heterologen Produktion der Gruppe 5-Hydrogenasen aus <i>Streptomyces avermitilis</i> und <i>Mycobacterium smegmatis</i> in <i>Ralstonia eutropha</i>	93
4	DISKUSSION	96
4.1	Überproduktion und Reinigung der AH	96
4.2	Katalytische Parameter der AH.....	100
4.2.1	Katalytische Aktivität der AH.....	100
4.2.2	Affinität der AH zu Wasserstoff.....	101
4.2.3	Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Aktivität der AH.....	102
4.3	Struktur und Cofaktorzusammensetzung der AH und deren möglicher Einfluss auf die Sauerstofftoleranz	103
4.3.1	Physiologische Relevanz der Dimerisierung.....	103
4.3.2	Das [NiFe]-Zentrum und der katalytische Zyklus	106
4.3.3	Die Elektronentransportkette der AH	109
4.3.4	Variation des Aspartats am proximalen Cluster modifiziert die O ₂ -Toleranz der AH ..	111
4.3.5	Mögliche Faktoren für die Sauerstoff-Insensitivität der AH	112
4.4	Physiologische Rolle der AH.....	114
4.4.1	Die Regulation der AH	115
4.4.2	Die AH ist eine energiekonservierende Hydrogenase.....	117
4.5	Maturation der AH	118
4.6	Heterologe Expression von Hydrogenasen in <i>Ralstonia eutropha</i>	119
4.7	Perspektiven	120
5	LITERATUR	121
	Danksagung	132
	Selbstständigkeitserklärung	133

Abkürzungsverzeichnis

% [v/v]	Volumenprozent
% [w/v]	Gewichtsprozent
Å	Angström
AH	Actinobakterielle Hydrogenase
Aut	Minimalmedium für autotrophes Zellwachstum
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Capso	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-Propansulfonsäure
CN-PAGE	farblose, native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronen-Paramagnetische Resonanz
[FeS]	Eisen-Schwefel
FGN	Fruktose-Glycerin-Minimalmedium
FMN	Flavin-Mononukleotid
FN	Fruktose-Minimalmedium
FNR	Fumarat-Nitrat-Reduktase
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Hmd	H ₂ -bildende H ₄ MPT-Dehydrogenase
ICP-OES	Induktiv gekoppeltes Plasma-Optische Emissionsspektroskopie
Isc	Iron-Sulfur-Cluster
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
K _M	Michaeliskonstante
LB	Luria-Bertani-Medium
MBH	Membrangebundene Hydrogenase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte/reduzierte Form)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
[NiFe]	Nickel-Eisen
[NiFeSe]	Nickel-Eisen-Selen
OD ₄₃₆	Optische Dichte bei 436 nm
ORF	Offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PMS	Phenazinmethosulfat
ppb/ppm	parts per billion/ million
PSI	pound per square-inch
R ²	Bestimmtheitsmaß
RH	Regulatorische Hydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH	Lösliche Hydrogenase
Suf	Sulfur-Mobilisation
TBE	Tris-Borat-Essigsäure-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units Enzymaktivität
UV/Vis	Ultravioletter/sichtbarer Bereich elektromagnetischer Strahlung

1 Einleitung

1.1 Der biogeochemische Wasserstoffkreislauf und die Bedeutung der Hydrogenase-vermittelten mikrobiellen H₂-Aufnahme

Wasserstoff kommt in der Atmosphäre in einer Menge von durchschnittlich 530 ppb vor und ist damit nach Methan der zweithäufigste reduzierende Gasbestandteil in der Luft (Schmidt, 1974; Novelli *et al.*, 1999). Wie die meisten Bestandteile der Atmosphäre ist auch H₂ einem komplexen biogeochemischen Zyklus aus Freisetzung und Aufnahme unterworfen, zu dem jeweils eine Reihe natürlicher und anthropogener Prozesse beitragen. Die wichtigsten Prozesse für die Entstehung von H₂ sind die photochemische Reaktionen von Methan und anderen Kohlenwasserstoffen mit atmosphärischen Sauerstoffradikalen und die Verbrennung von Biomasse sowie fossiler Brennstoffe (Novelli *et al.*, 1999; Constant *et al.*, 2009). Des Weiteren wird Wasserstoff unter anderem bei der Stickstofffixierung durch Mikroorganismen erzeugt. Von dem so produzierten H₂ wird jedoch oft nur ein Bruchteil in die Atmosphäre emittiert; in vielen Fällen wird ein Großteil des produzierten H₂ durch den produzierenden Organismus selbst oder durch wasserstoffoxidierende Bakterien sofort wieder verbraucht (Conrad & Seiler, 1980; Lafavre & Focht, 1983; Tamagnini *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2010). Durch fermentative Prozesse in Sedimenten erzeugter Wasserstoff wird nahezu vollständig durch H₂-oxidierende Mikroorganismen wie Methanogene und Sulfatreduzierer verbraucht und gelangt kaum in die Atmosphäre (Vignais & Billoud, 2007). Zum Verbrauch von Wasserstoff aus der Atmosphäre tragen fast ausschließlich zwei Prozesse bei. Zum Einen wird Wasserstoff in der Atmosphäre durch Sauerstoffradikale zersetzt, wobei H₂O, O₂ bzw. O₃ als Hauptprodukte gebildet werden (Novelli *et al.*, 1999; Ehhalt & Rohrer, 2009). Der in größerem Umfang ablaufende Prozess ist jedoch die Aufnahme von H₂ in Böden; sie wird für rund 80 % des H₂-Verbrauchs aus der Atmosphäre verantwortlich gemacht (Novelli *et al.*, 1999; Constant *et al.*, 2009). Der Mechanismus der Wasserstoffaufnahme in Böden war lange Zeit unklar. Erst vor wenigen Jahren wurde entdeckt, dass einige Bakterienarten aus der Gattung *Streptomyces* in der Lage sind, Wasserstoff in atmosphärischen Konzentrationen aufzunehmen (Constant *et al.*, 2008; Constant *et al.*, 2011a). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Streptomyceten wurde postuliert, dass diese Bakterien für die Aufnahme des atmosphärischen H₂ in Böden verantwortlich sind. Die Fähigkeit zur hochaffinen H₂-Aufnahme einiger *Streptomyces*-Spezies wurde mit im Genom dieser Arten vorkommenden Genen einer vermuteten [NiFe]-Hydrogenase korreliert (Constant *et al.*, 2010).

1.2 Bedeutung und Klassifizierung von Hydrogenasen

1.2.1 Strukturelle und funktionelle Vielfalt von Hydrogenasen

Hydrogenasen (H₂:(Akzeptor)-Oxidoreduktasen; EC 1.12.-.-) sind eine Klasse von Metalloenzymen, die eine Schlüsselrolle im bakteriellen H₂-Stoffwechsel spielen. Sie

katalysieren die Spaltung von molekularem Wasserstoff (H_2) in zwei Protonen und zwei Elektronen und unter bestimmten Bedingungen auch die Umkehrreaktion. Hydrogenasen kommen in allen drei Domänen des Lebens vor (Bacteria, Archaea, Eukaryota), überwiegend jedoch in Bakterien und Archaeen (Vignais & Billoud, 2007). Sie sind strukturell divers und erfüllen mehrere Aufgaben. Zum Einen dienen Hydrogenasen dazu, Wasserstoff als energiereiches Substrat für den respiratorischen Stoffwechsel zugänglich zu machen, zum Anderen dienen bei fermentativem Wachstum Hydrogenasen zur Entfernung überschüssiger Elektronen, wobei H_2 freigesetzt wird (Vignais & Billoud, 2007; Schwartz *et al.*, 2013). Im respiratorischen Stoffwechsel werden Hydrogenasen mit unterschiedlichen Elektronentransportketten gekoppelt, womit die aus der Oxidation von H_2 gewonnenen Elektronen auf zahlreiche terminale Akzeptoren übertragen werden können. Wichtige Akzeptoren sind unter Anderem CO_2 , Sulfat, Nitrat, Fe^{3+} sowie Sauerstoff (Vignais & Billoud, 2007; Schwartz *et al.*, 2013). Die energetisch vorteilhafteste Bruttoreaktion kommt mit O_2 als terminalem Akzeptor zustande. Sie besitzt ein Redoxpotential von $\Delta E^0 = 1,23 \text{ V}$ sowie eine maximal nutzbare freie Energie von $\Delta G^0 = 237,2 \text{ kJ/mol}$ für die Bildung von 1 mol H_2O .

1.2.2 Hydrogenasen werden in drei Klassen eingeteilt

Hydrogenasen werden aufgrund der Metallcofaktoren, an denen die katalytische Umsetzung von H_2 stattfindet, in die drei phylogenetisch nicht verwandten Klassen [NiFe]-, [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen eingeteilt (Vignais *et al.*, 2001). Dabei sind [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen weit verbreitet, während [Fe]-Hydrogenasen lediglich in einigen cytochromfreien methanogenen Archaeen vorkommen. In dieser Klasse wird Wasserstoff jedoch nicht wie in allen anderen Hydrogenasen in Protonen und Elektronen gespalten. Sie katalysieren stattdessen die Reduktion von Methenyltetrahydromethanopterin (Methenyl- H_4MPT^+) mit H_2 zu Methyl-H $_4\text{MPT}$ als Zwischenstufe der Reduktion von CO_2 zu Methan (Schwartz *et al.*, 2013). Diese auch Hmd (H_2 -bildende H_4MPT -Dehydrogenase)-Hydrogenasen genannten Enzyme besitzen als aktives Zentrum einen Eisen-Guanylylpyridinol-Cofaktor, der kovalent an das Protein gebunden ist (Abbildung 1-1). Sie werden ausschließlich unter Nickelmangel gebildet; bei ausreichenden Nickelkonzentrationen werden sie durch F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenasen ersetzt (Thauer *et al.*, 2010).

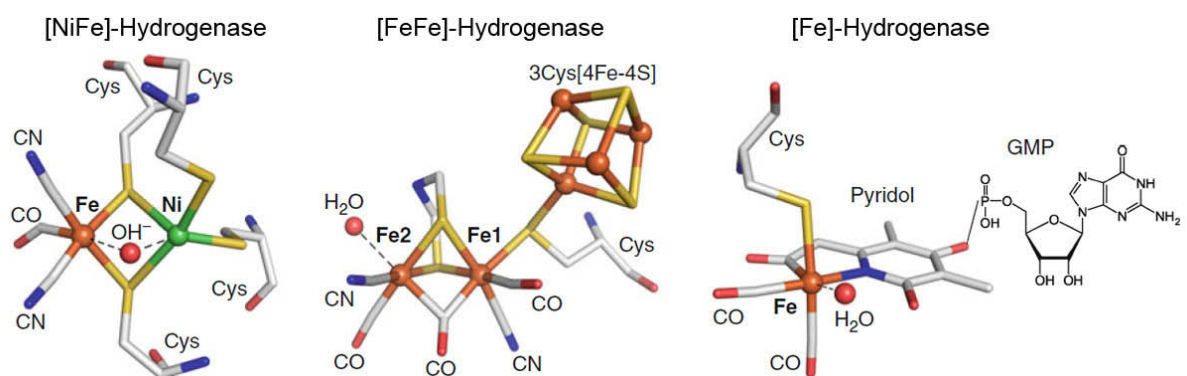


Abbildung 1-1: Aktive Zentren für die Oxidation bzw. Produktion von H_2 in den drei Enzymklassen [NiFe]-Hydrogenasen, [FeFe]-Hydrogenasen und [Fe]-Hydrogenasen. Die Metallatome der aktiven Zentren sind als Sphären dargestellt. Die Substratbindestelle ist jeweils durch eine rote Sphäre sowie eine gestrichelte Linie angedeutet. Die Abbildung wurde modifiziert aus Schwartz *et al.*, 2013, übernommen.

1.2.3 [FeFe]-Hydrogenasen

[FeFe]-Hydrogenasen kommen in anaeroben Bakterien wie Sulfatreduzierern und Clostridien sowie in Organellen einiger weniger niederer Eukaryoten vor. Die Hauptfunktion dieser Enzymklasse ist in der Regel die Produktion von Wasserstoff (Vignais & Billoud, 2007). Diese Hydrogenasen sind hochempfindlich gegenüber Sauerstoff und kommen heterogen als monomere, dimere, trimere oder tetramere Enzyme vor. Allen [FeFe]-Hydrogenasen ist der sogenannte H-Cluster gemeinsam. In dieser prosthetischen Gruppe ist ein gewöhnlicher [4Fe4S]-Cluster über ein einzelnes Cystein mit einem Zentrum aus zwei Fe-Atomen verknüpft, die durch CN⁻- und CO-Moleküle sowie ein verbrückendes Di(thiomethyl)amin ligandiert werden (Abbildung 1-1; Peters *et al.*, 1998; Nicolet *et al.*, 1999; Silakov *et al.*, 2009). Die katalytische Reaktion findet dabei am zum [4Fe4S]-Cluster distal gelegenen Eisen statt, welches dabei die Oxidationsstufen +I und +II annimmt (Fontecilla-Camps *et al.*, 2007; Mulder *et al.*, 2011).

1.2.4 Katalytische Eigenschaften und Klassifizierung von [NiFe]-Hydrogenasen

Die Mehrzahl der bislang untersuchten Hydrogenasen gehören zur Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen. In ihnen erfolgt die katalytische Reaktion an einem konservierten aktiven Zentrum, das die Metalle Fe und Ni enthält. [NiFe]-Hydrogenasen bestehen mindestens aus einer großen Untereinheit, welche das [NiFe]-Zentrum trägt, und einer kleinen Untereinheit, die eine Elektronentransportkette aus einem oder mehreren [FeS]-Clustern und teilweise noch weiteren Cofaktoren beherbergt (Burgdorf *et al.*, 2005a; Fontecilla-Camps *et al.*, 2007). Das aktive [NiFe]-Zentrum besteht aus einem durch vier Cysteine koordinierten Ni-Atom sowie einem Fe-Atom mit 2 Cyanid- und einem Carbonylliganden (Abbildung 1-1; Volbeda *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 1997). Zwei der vier koordinierenden Cysteine nehmen dabei eine verbrückende Position zwischen dem Ni und dem Fe-Ion ein. An der dritten möglichen verbrückenden Position findet die Umsetzung von Wasserstoff sowie unter aeroben Bedingungen der Angriff von Sauerstoff statt. Während der Katalyse können verschiedene Zustände des aktiven Zentrums identifiziert werden, die sich hinsichtlich der Oxidationsstufen der Metalle sowie der gebundenen Liganden voneinander unterscheiden. Gemäß der gängigen Nomenklatur wird zwischen den paramagnetischen, mittels EPR-Spektroskopie detektierbaren Zuständen (z. B. Ni_U-A, Ni_I-B, Ni_a-C) und diamagnetischen, in der EPR-Spektroskopie unsichtbaren Zuständen (mehrere Ni-S und Ni-R) unterschieden (Cammack *et al.*, 1982; Pandelia *et al.*, 2010; Abbildung 1-2). Die wichtigsten aktiven Zustände sind Ni_a-C, Ni_a-S und Ni_a-R. Daneben treten in Standard-Hydrogenasen bei Kontakt mit Sauerstoff inaktive Zustände auf, die sich durch unterschiedliche Reaktivierungskinetiken unterscheiden. Der Zustand Ni_I-B (=ready) enthält einen Hydroxo-Liganden am aktiven Zentrum und kann durch H₂ schnell aktiviert werden, während der Zustand Ni_U-A (=unready) mutmaßlich durch einen Peroxoliganden am aktiven Zentrum gekennzeichnet ist und nur schwer reaktiviert werden kann (Pandelia *et al.*, 2010; Shafaat *et al.*, 2013).

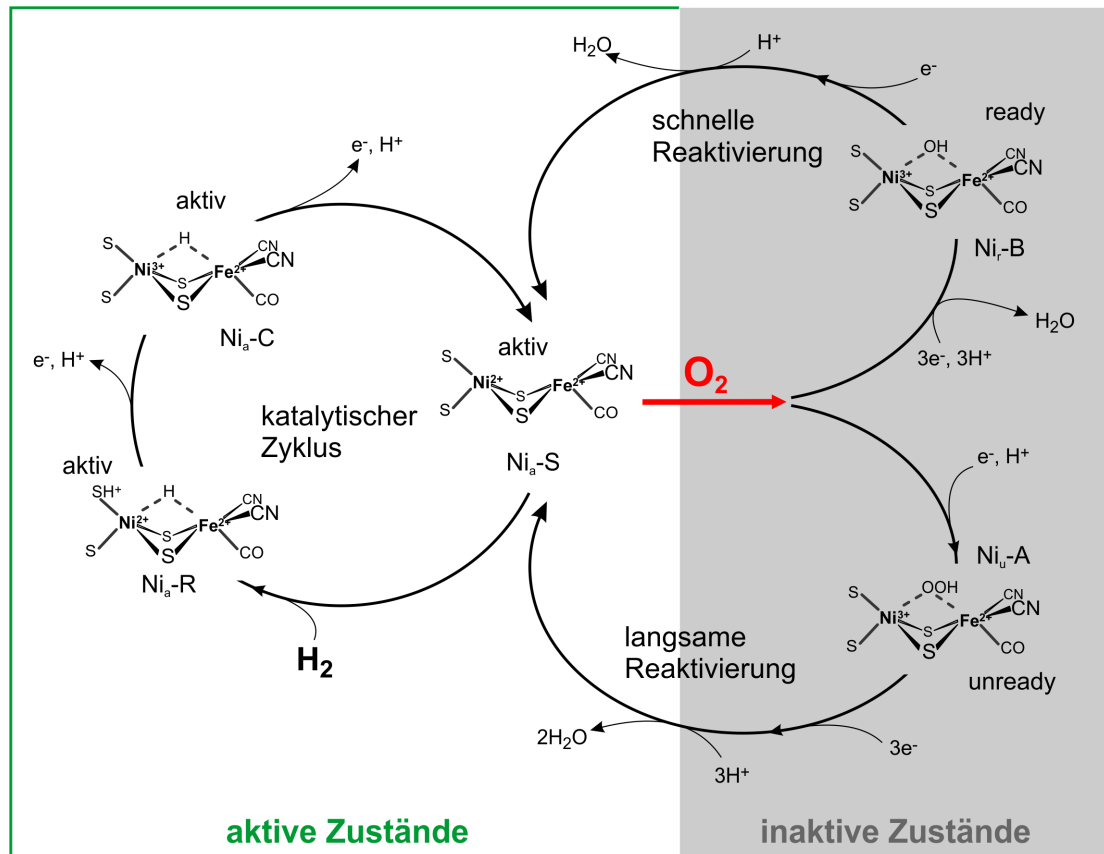


Abbildung 1-2: Allgemeiner katalytischer Zyklus von [NiFe]-Hydrogenasen mit den Inaktivierungs-/Aktivierungszyklen in Gegenwart von Sauerstoff. Im linken Teil ist der Zyklus der H_2 -Oxidation vereinfacht dargestellt. Der rechte Teil zeigt die Bildung von inaktiven Ni_u-A - und Ni_r-B -Zuständen und deren Reaktivierung. Ni_u-A und Ni_r-B unterscheiden sich durch die gebundene Sauerstoffspezies und die Reaktivierungsgeschwindigkeit. Die Abbildung fasst die von Siegbahn *et al.*, 2007, und Armstrong *et al.*, 2009, dargestellten Mechanismen vereinfacht zusammen. Die Identität des Liganden im Ni_u-A -Zustand ist noch nicht eindeutig geklärt.

Gemäß ihrer physiologischen Funktion, ihrer Zusammensetzung und ihrer Lokalisation im Organismus wurden die [NiFe]-Hydrogenasen bislang in vier Gruppen eingeteilt. Ein wichtiger Anhaltspunkt für die Klassifikation waren überdies hoch konservierte Sequenzmotive im Bereich der koordinierenden Cysteine für das [NiFe]-Zentrum. Je nach Untergruppe treten unterschiedliche Konsensussequenzen dieser Motive auf (Vignais & Billoud, 2007). Die erste Gruppe besteht gemäß der Einteilung von Vignais & Billoud, 2007, aus H_2 -oxidierenden Hydrogenasen, die an die Cytoplasmamembran gebunden sind und die aus Wasserstoff gewonnenen Elektronen in den dortigen Chinonpool abgeben. Neben der großen und kleinen Hydrogenase-Untereinheit kommt hier als dritte Untereinheit ein Cytochrom *b* mit zwei Hämen vor, welches das Enzym an der Membran verankert. Diese Enzymgruppe wird mittels des „Twin-Arginin“-Transportweges (Tat) ins Periplasma exportiert (Palmer & Berks, 2012). Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise die membrangebundene Hydrogenase (MBH) aus *R. eutropha* (Lenz *et al.*, 2010). Gruppe 2 enthält cytoplasmatische Hydrogenasen, die wiederum in die Untergruppe der cyanobakteriellen H_2 -oxidierenden Hydrogenasen (2a) und der H_2 -Sensoren (2b) unterteilt wird. Enzyme der Subgruppe 2a kommen in der Regel in N_2 -fixierenden Cyanobakterien vor, wo sie den durch Nitrogenasen produzierten Wasserstoff

oxidieren (Tamagnini *et al.*, 2007). In Subgruppe 2b werden Hydrogenasen zusammengefasst, die H_2 sensieren und über ein Zweikomponentensystem eine Regulationsantwort erzeugen. Die regulatorische Hydrogenase (RH) aus *R. eutropha* gehört zu dieser Gruppe (Bernhard *et al.*, 2001). Die dritte Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen umfasst bidirektionale, cytoplasmatische Hydrogenasen, die zusätzliche Untereinheiten für die Bindung löslicher Substrate haben. Hierzu gehören die F_{420} -reduzierenden Hydrogenasen aus Archaeen, $NADP^+$ -reduzierende Hydrogenasen, Methylviologen reduzierende Hydrogenasen sowie bidirektionale, NAD^+ und/oder $NADP^+$ -reduzierende Hydrogenasen wie die lösliche Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* (Burgdorf *et al.*, 2005a). Gruppe 4-[NiFe]-Hydrogenasen sind H_2 -produzierende Hydrogenasen, die komplexe multimere Zusammensetzungen haben und an die Membran gebunden sind. Sie dienen zur Entfernung überschüssiger Reduktionsäquivalente, die beispielsweise bei der anaeroben Oxidation von Formiat entstehen. Ein prototypisches Beispiel für diese Gruppe ist die Hydrogenase-3 aus *E. coli* als Teil des Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes (Sawers, 2005).

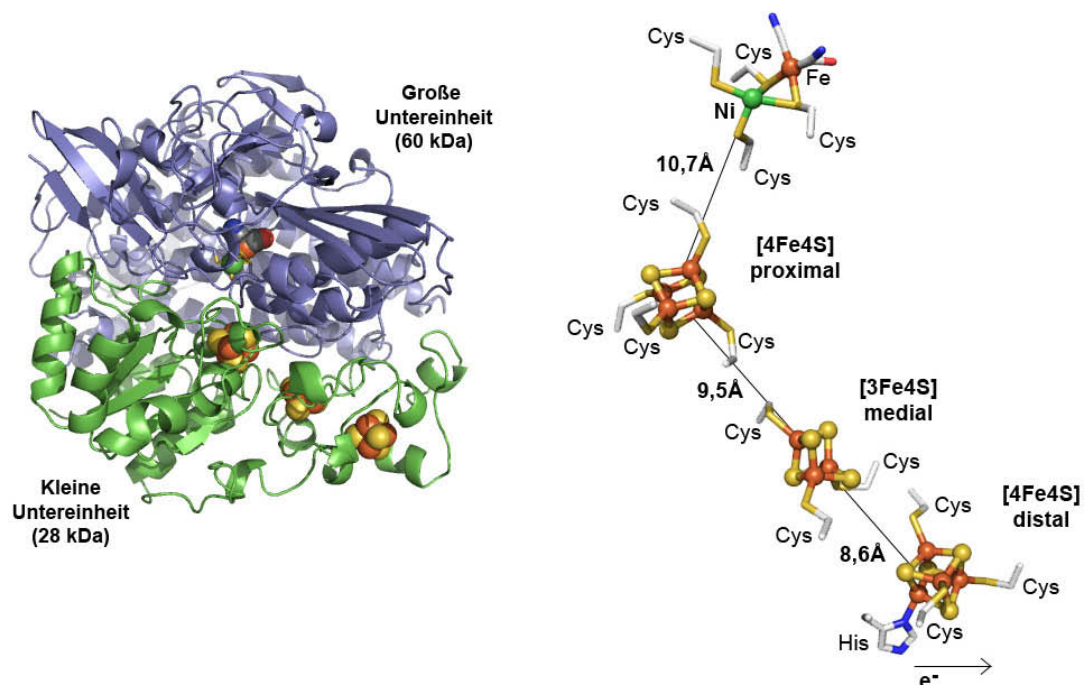


Abbildung 1-3: Gesamtstruktur und Elektronentransportkette der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (PDB 2FRV) als typischer Vertreter der Gruppe 1 der [NiFe]-Hydrogenasen. Linker Teil: Gesamtstruktur mit Lage des aktiven Zentrums und der [FeS]-Cluster. Rechter Teil: Elektronentransportkette innerhalb der Hydrogenase mit Abständen zwischen den Cofaktoren.

1.3 Putativ hochaffine Hydrogenasen bilden eine eigene Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen

Für einige sporenbildende *Streptomyces*-Arten konnte gezeigt werden, dass sie zur hochaffinen Aufnahme von H_2 befähigt sind und vermutlich den in der Luft vorhandenen Wasserstoff (0,5 ppm) aufnehmen können (Constant *et al.*, 2010). Die hohe Affinität der H_2 -Aufnahme wurde dabei ausschließlich in Sporen gefunden (Constant *et al.*, 2008). Diese

Arten unterschieden sich von anderen *Streptomyces*-Arten dadurch, dass in ihren Genomen eine besondere [NiFe]-Hydrogenase codiert ist. Sequenzvergleiche machten deutlich, dass die Gene dieser Hydrogenase in den betreffenden Arten hochkonserviert sind, die davon abgeleiteten Proteine aber deutlich von bislang charakterisierten Hydrogenasen abweichende Merkmale aufweisen. Homologe Gene wurden in zahlreichen weiteren Arten vor allem aus dem Phylum der Actinobakterien, aber auch in einigen Proteobakterien, Chloroflexi und Acidobakterien gefunden. Sie ist somit unter Bakterien weit verbreitet. Aufgrund der von anderen [NiFe]-Hydrogenasen abweichenden Merkmale und ihrer vermutlichen Funktion der hochaffinen H₂-Aufnahme wurden diese putativen Hydrogenasen unter dem Namen „hochaffine H₂-oxidierende Hydrogenasen“ als Gruppe 5 der [NiFe]-Hydrogenasen klassifiziert (Constant *et al.*, 2011b).

Die Definition dieser neuen Gruppe stützt sich zum Einen auf die Ähnlichkeit im Aufbau des Operons sowie der darin codierten Gene. Zum Anderen enthalten die Sequenzen der großen Untereinheiten konservierte Sequenzmotive, die für die Gruppe 5 spezifisch sind (Constant *et al.*, 2011b). Dieses Kriterium wurde auch zur Definition der Gruppen 1-4 herangezogen (Vignais & Billoud, 2007). Gemäß Constant *et al.*, 2011b, enthalten die Operons der Gruppe 5- Hydrogenasen in der Regel 12-15 offene Leseraster (open reading frame, ORF). Neben den Genen für eine große und eine kleine Hydrogenase-Untereinheit beherbergen die Operons die Gene aller zur Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen benötigten Reifungsfaktoren HypABCDEF sowie der Endoprotease HupD, welche den C-Terminus der großen Untereinheit prozessiert (Abbildung 1-4). In einigen Operons kommt zudem das Gen *hypX* vor, das einen an der Maturation von Hydrogenasen unter aeroben Bedingungen beteiligten Reifungsfaktor codiert (Constant *et al.*, 2011b; Rey *et al.*, 1996; Bürstel, 2013). Des Weiteren sind 4 ORFs vorhanden, die innerhalb der Gruppe 5-Operons konserviert sind, aber keine Ähnlichkeit zu Genen mit bereits bekannter Funktion aufweisen. Der natürliche Elektronenakzeptor dieser Hydrogenasen könnte durch eines dieser Gene codiert werden (Constant *et al.*, 2011b). In den Operons der verschiedenen Vertreter sind die Gene der großen und der kleinen Untereinheit stets zusammen mit den unbekannten ORFs angeordnet, während die übrigen Gene des Operons nicht in festgelegter Anordnung vorkommen. In den Aminosäuresequenzen der großen Untereinheiten sind die vier Cysteine konserviert, die ein [NiFe]-Zentrum koordinieren können. Sie bilden zusammen mit den umgebenden Aminosäuren zwei konservierte Sequenzmotive, deren Konsensussequenzen sich von denen der Gruppen 1-4 unterscheiden. Das Fehlen eines Signalpeptids für das Twin-Arginin Transportsystem an den N-Termini der kleinen Untereinheiten deutet auf eine cytoplasmatische Lokalisierung hin.

Bislang wurde nur für wenige Organismen gezeigt, dass aktive Gruppe 5-Hydrogenasen gebildet werden. Zum Einen gibt der bereits zu Beginn dieses Kapitels beschriebene Zusammenhang zwischen hochaffiner H₂-Aufnahme und der Anwesenheit des Gruppe 5-Hydrogenase-Operons in einer Reihe von *Streptomyces*-Stämmen (Constant *et al.*, 2010) einen deutlichen Hinweis auf funktionale Gruppe 5-Hydrogenasen. Zum Anderen wurde in *Mycobacterium smegmatis* die H₂-Oxidationsaktivität einer Gruppe 5-Hydrogenase nachgewiesen (Berney *et al.*, 2013). Bei Wachstum unter Kohlenstofflimitation wurde eine erhöhte Enzymaktivität sowie eine stark erhöhte Expression der Gruppe 5-Hydrogenase-Gene festgestellt (Berney *et al.*, 2013; Berney & Cook, 2010). In *Frankia sp.* wurden Transkripte von Gruppe 5-Hydrogenasen nachgewiesen (Leul *et al.*, 2007). Zusammen weisen

diese Ergebnisse auf die Bildung funktionaler Gruppe 5-Hydrogenasen in verschiedenen Organismen hin. Eine Gruppe 5-Hydrogenase ist auch in dem β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* codiert (Abbildung 1-4; Schwartz *et al.*, 2003).

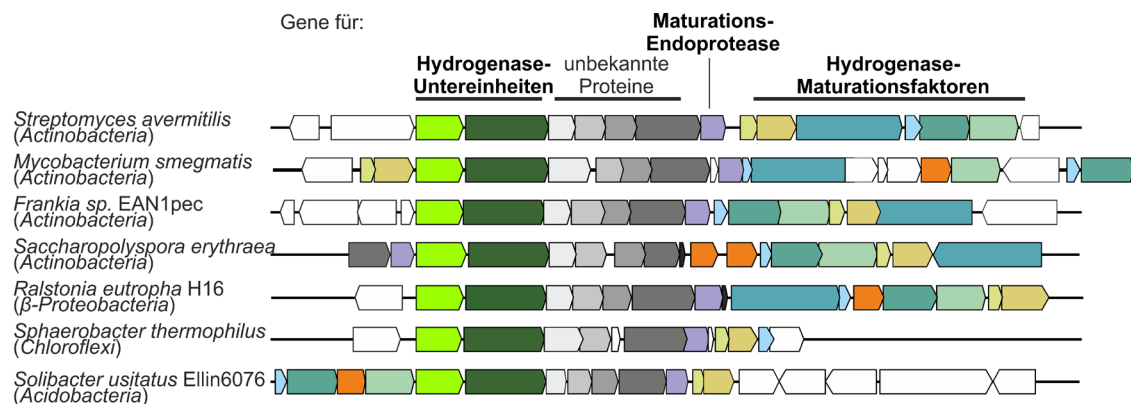


Abbildung 1-4: Alignment ausgewählter Operons von Gruppe 5-[NiFe]-Hydrogenasen. Die Gene der Hydrogenase-Untereinheiten und die unbekannten ORFs treten immer hintereinander auf, die Maturationsgene besitzen keine konservierte Anordnung im Operon. Die orangefarben dargestellten Gene codieren eine Heptosephosphat-Isomerase, deren Funktion im Operon unbekannt ist.

1.4 Wasserstoffmetabolismus und Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*

1.4.1 Metabolische Flexibilität von *R. eutropha*

Das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*, heute gemäß offizieller Nomenklatur *Cupriavidus necator*; Vandamme & Coenye, 2004) ist seit langem als Modellorganismus für Lithoautotrophie und Wasserstoffmetabolismus etabliert (Burgdorf *et al.*, 2005a; Cramm, 2009; Schwartz *et al.*, 2013). Überdies wurde die Fähigkeit des Bakteriums zur Produktion des „Bioplastiks“ Polyhydroxybutyrat (PHB) eingehend untersucht (Steinbüchel & Schlegel, 1991). Das obligat respiratorische β -Proteobakterium *R. eutropha* kommt natürlicherweise in Böden und Gewässern vor. Es bevorzugt die aerobe Atmung, kann aber unter Sauerstoffmangel auch Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Aragno & Schlegel, 1992). Für das heterotrophe Wachstum kann *R. eutropha* zahlreiche organische Moleküle als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, darunter unter anderem Fructose, Glycerin, Succinat und einige Aminosäuren. Zudem ist *R. eutropha* in der Lage, lithoautotroph mit CO_2 als Kohlenstoff- und H_2 als Energiequelle zu wachsen. Hierfür besitzt der Organismus mehrere Enzyme aus der Klasse der [NiFe]-Hydrogenasen (Burgdorf *et al.*, 2005a). Bisher wurden in *R. eutropha* eine membrangebundene Hydrogenase (MBH; Gruppe 1), eine NAD^+ -reduzierende lösliche Hydrogenase (SH; Gruppe 3d) sowie eine regulatorische Hydrogenase (RH; Gruppe 2b) charakterisiert (Lenz *et al.*, 2010; Horch *et al.*, 2012; Buhrke *et al.*, 2004). Da das Bakterium in der Regel aerob lebt, können die bislang beschriebenen Hydrogenasen im Gegensatz zu vielen anderen [NiFe]-Hydrogenasen auch in Gegenwart von Sauerstoff Katalyse betreiben (Fritsch *et al.*, 2013).

1.4.2 Hydrogenasen in *R. eutropha*

Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) aus *R. eutropha* besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, HoxK und HoxG, sowie einer mit Cytochromen *b* verwandten dritten Untereinheit HoxZ, die die MBH mit der Cytoplasmamembran verknüpft (Abbildung 1-5; Lenz *et al.*, 2010). Die durch Oxidation von H_2 am [NiFe]-Zentrum in HoxG gewonnenen Elektronen werden über eine Elektronentransportkette an den Chinonpool in der Cytoplasmamembran weitergegeben. Teil dieser Elektronentransportkette sind drei [FeS]-Cluster in HoxK sowie zwei *Häm*-Moleküle in HoxZ. In HoxK werden distal und medial zum [NiFe]-Zentrum ein durch drei Cysteine und ein Histidin koordinierter [4Fe4S]-Cluster bzw. ein durch drei Cysteine koordinierter [3Fe4S]-Cluster gebildet (Fritsch *et al.*, 2011b). Der proximale Cluster jedoch ist ein ungewöhnlicher [4Fe3S]-Cluster, der durch 6 Cysteine koordiniert wird und bislang nur in der MBH und ähnlichen sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen gefunden wurde (Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012; Pandelia *et al.*, 2012). Die MBH ist im Periplasma lokalisiert, wohin sie als maturiertes Protein mittels des Tat-Transportweges exportiert wird (Palmer & Berks, 2012).

Die lösliche Hydrogenase (SH) befindet sich im Cytoplasma. Sie besteht neben der großen Hydrogenase-Untereinheit HoxH und der kleinen Untereinheit HoxY aus den Untereinheiten HoxF und HoxU, die die Umsetzung von NAD^+ zu NADH katalysieren (Abbildung 1-5). Letztere Untereinheiten sind homolog zu den Untereinheiten NuoF und NuoG des Komplex I (Burgdorf *et al.*, 2005a). Die Untereinheiten HoxHY und HoxFU werden als Hydrogenase- bzw. Diaphorase-Modul bezeichnet. Zusammen bilden die Untereinheiten der SH eine Elektronentransportkette von Wasserstoff auf NAD^+ . Im Hydrogenasemodul findet sich neben dem [NiFe]-Zentrum in HoxH ein [4Fe4S]-Cluster sowie vermutlich ein FMN-Molekül (Lauterbach *et al.*, 2011b; van der Linden *et al.*, 2004). Das Diaphorase-Modul beherbergt in HoxU zwei [4Fe4S]- sowie einen [2Fe2S]-Cluster. In HoxF wurde ein [4Fe4S]-Cluster sowie ein zweites FMN gefunden (Lauterbach *et al.*, 2011a). Der heterotetramere SH-Komplex ist stabil, jedoch zeigen auch die separaten Module H_2 -Oxidations- bzw. NAD^+ -Reduktionsaktivität (Lauterbach *et al.*, 2011b; Lauterbach *et al.*, 2011a). Des Weiteren kann die SH in einer hexameren Form gereinigt werden, in der zusätzlich zwei Untereinheiten HoxI vorkommen. Diese Untereinheiten haben eine regulatorische Funktion und dienen eventuell der Bindung von $NADP^+$ als alternativem Elektronenakzeptor (Burgdorf *et al.*, 2005b, Lauterbach *et al.*, 2013). Die SH ist im oxidierten as-isolated-Zustand inaktiv, kann aber neben NADH auch durch NADPH oder verschiedene Reduktionsmittel reaktiviert werden (Schneider & Schlegel, 1976). Sowohl die SH als auch die MBH sind energiekonservierende Hydrogenasen, die die bei der Oxidation von H_2 freigesetzte Energie in eine vom Bakterium nutzbare Form überführen.

Im Gegensatz dazu erfüllt die regulatorische Hydrogenase (RH) keine energiekonservierende Funktion, sondern sensiert als Teil einer Regulationskaskade, ob Wasserstoff vorhanden ist. Die Hydrogenase-Untereinheiten HoxBC interagieren hierzu mit der Histidin-Kinase HoxJ, die wiederum den Response-Regulator HoxA steuert (Abbildung 1-5; Buhrke *et al.*, 2004). Auf diesem Weg wird in bestimmten *Ralstonia eutropha*-Stämmen die Expression der MBH und SH in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Wasserstoff reguliert. Die meisten der experimentell verwendeten Stämme von *R. eutropha* (einschließlich des sogenannten „Wildtyps“ *R. eutropha* H16) tragen eine Mutation in *hoxJ*, die die wasserstoffabhängige

Regulation deaktiviert (Lenz & Friedrich, 1998). Die Elektronentransportkette der RH enthält neben dem [NiFe]-Zentrum in HoxC drei [4Fe4S]-Cluster in der kleinen Untereinheit HoxB.

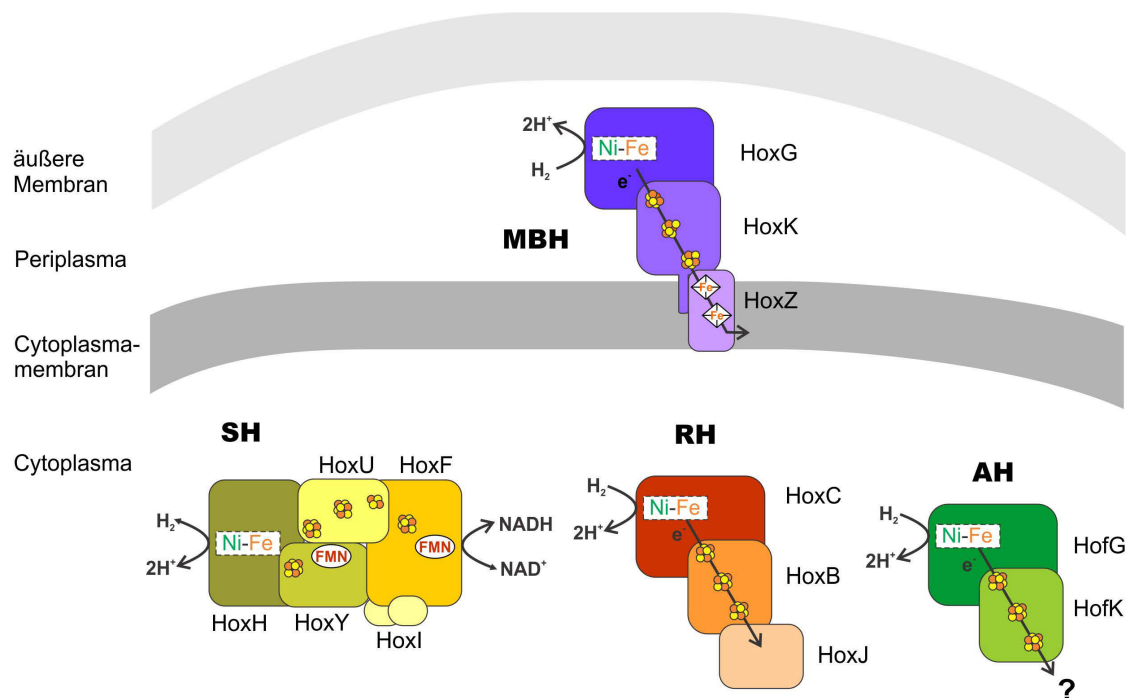


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Hydrogenasen in *R. eutropha*. Neben den drei bereits zuvor charakterisierten Hydrogenasen MBH, SH und RH ist auch ein aus der Aminosäuresequenz abgeleitetes Modell der in dieser Arbeit untersuchten AH dargestellt. Details der Hydrogenasen sind im Text beschrieben.

1.4.3 Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen in *R. eutropha*

Eine Besonderheit von [NiFe]-Hydrogenasen in Knallgasbakterien ist ihre Fähigkeit, auch in Gegenwart von Sauerstoff Katalyse zu betreiben. Diese Fähigkeit wird als Sauerstofftoleranz bezeichnet. Für die MBH wurde gezeigt, dass die H_2 -Oxidationsaktivität zwar mit steigender O_2 -Konzentration sinkt, aber nach Entfernen des Sauerstoffs wieder ungefähr den Ausgangswert erreicht. Auch die SH wird durch Sauerstoff reversibel gehemmt (Schneider & Schlegel, 1981; Lauterbach *et al.*, 2011b). Im Gegensatz dazu werden sauerstoffsensitive Hydrogenasen durch Sauerstoff vollständig und irreversibel inaktiviert (Vincent *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 2009a). In sauerstofftoleranten Hydrogenasen kann im Gegensatz zu O_2 -empfindlichen Vertretern kein inaktiver Ni_0 -A-Zustand des aktiven Zentrums beobachtet werden (Cracknell *et al.*, 2009; Ludwig *et al.*, 2009a). Für die MBH konnte gezeigt werden, dass die Sauerstofftoleranz durch einen ungewöhnlichen [4Fe3S]-Cluster vermittelt wird, der durch zwei zusätzliche Cysteine ligandiert wird (Goris *et al.*, 2011; Fritsch *et al.*, 2011b). Varianten der MBH ohne diese zusätzlichen Cysteine werden durch O_2 irreversibel inaktiviert (Goris *et al.*, 2011). Der veränderte proximale Cluster hat im Gegensatz zu dem entsprechenden Cluster in Standard-Hydrogenasen eine offene, flexible Struktur, die einen zusätzlichen superoxidierten Zustand des Clusters ermöglicht (Abbildung 1-6). Nach dem

gängigen Modell stehen hierdurch in unmittelbarer Nähe des [NiFe]-Zentrums ausreichend Elektronen zur Verfügung, die am [NiFe]-Zentrum angreifenden Sauerstoff sofort zu Wasser und einem am [NiFe]-Zentrum gebundenen Hydroxidion reduzieren können. Diese Konfiguration am [NiFe]-Zentrum wird Ni_1 -B-Zustand genannt und kann durch ein weiteres Elektron unter Abspaltung von Wasser leicht wieder in einen katalytisch aktiven Zustand überführt werden (Fritsch *et al.*, 2013). In der SH sind die zusätzlichen Cysteine nicht vorhanden. Die SH wird bei aerober Reinigung in einem inaktiven Zustand erhalten, kann aber durch katalytische Mengen NADH reaktiviert werden (Schneider & Schlegel, 1976). Es wurde vorgeschlagen, dass das durch Kopplung mit dem NAD^+ /NADH-Pool erzielte niedrige Redoxpotential zusammen mit den in der Elektronentransportkette verfügbaren Elektronen eine Inaktivierung durch O_2 unter physiologischen Bedingungen weitgehend verhindert (Lauterbach *et al.*, 2011b). Auch wird das FMN-Molekül in der kleinen Hydrogenase-Untereinheit HoxY der SH als Elektronenreservoir für die Reduktion von O_2 zu Wasser in Betracht gezogen (Lauterbach & Lenz, 2013)

Ein anderes Verhalten gegenüber Sauerstoff wurde bei der RH gefunden. Die Aktivität dieser Hydrogenase wird durch Anwesenheit von Sauerstoff nicht verändert (Bernhard *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft wird darauf zurückgeführt, dass Sauerstoff aufgrund seiner Molekülgröße nicht in das aktive Zentrum gelangen kann. Der Austausch zweier voluminöser Aminosäuren am potenziellen Gaskanal, der das [NiFe]-Zentrum mit der Proteinoberfläche verbindet, führte zu O_2 -sensitivem Verhalten (Buhrke *et al.*, 2005). Die Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen in *R. eutropha* wird somit durch mindestens zwei unterschiedliche Strategien erreicht.

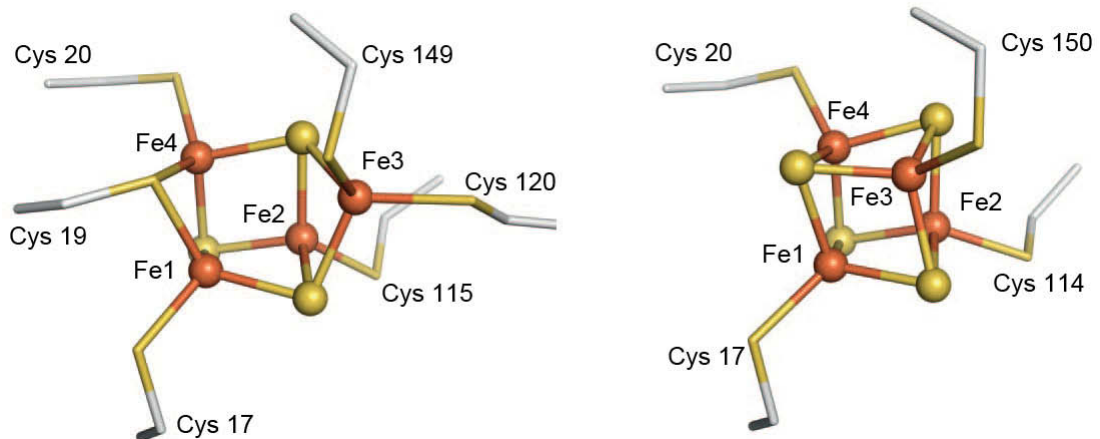


Abbildung 1-6: Proximale Cluster der sauerstofftoleranten MBH aus *R. eutropha* (PDB 3RGW; links) und der sauerstoffempfindlichen Standardhydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Myazaki F (PDB 1WUL; rechts). Im Gegensatz zu dem geschlossenen [4Fe4S]-Cluster sauerstoffempfindlicher Hydrogenasen liegt der proximale [4Fe3S]-Cluster in einer offenen Form vor, die zusätzliche Redoxzustände ermöglicht. Die Abbildung wurde aus Fritsch *et al.*, 2011b, übernommen.

1.4.4 Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen

Alle [NiFe]-Hydrogenasen sind einem komplexen Reifungsmechanismus unterworfen. Während die [FeS]-Cluster in den kleinen Hydrogenaseuntereinheiten sehr wahrscheinlich durch das universelle Iron-Sulfur-Cluster-(Isc) oder Sulfur-Mobilisation- (Suf) System gebildet

werden (Py & Barras, 2010), wird für die Maturation des [NiFe]-Zentrums eine Kaskade aus den sechs Reifungsfaktoren HypCDEFAB benötigt (Schwartz *et al.*, 2013; Böck *et al.*, 2006). Das angenommene Modell basiert vornehmlich auf Untersuchungen an Hyd-3 aus *Escherichia coli*. Hierbei werden mit Hilfe der Proteine HypE und HypF die Cyanid-Liganden aus Carbamoylphosphat synthetisiert (Reissmann *et al.*, 2003; Blokesch *et al.*, 2004). HypC und HypD dienen als Gerüst, an dem die Cyanidliganden sowie ein CO-Molekül an ein Fe-Ion binden und in dieser Zusammensetzung in die Apo-Form der großen Hydrogenase-Untereinheit inseriert werden (Bürstel *et al.*, 2012). Die genaue Herkunft des Eisenions und des CO-Moleküls ist noch unbekannt, für letzteres wird jedoch eine intramolekulare Quelle angenommen (Bürstel *et al.*, 2011). Mittels der Proteine HypA und HypB wird ein Ni-Atom bereitgestellt, welches in der großen Untereinheit durch vier Cysteine koordiniert wird (Blokesch *et al.*, 2002). An die prämatüre Untereinheit ist während dieser Schritte ein HypC-Protein gebunden, welches nach erfolgtem Einbau des [NiFe]-Zentrums abfällt. Im Anschluss an die erfolgte Insertion des [NiFe]-Zentrums wird zudem am C-Terminus der großen Untereinheit eine Sequenz von ca. 30 Aminosäuren durch eine spezifische Endoprotease abgespalten, um eine Assemblierung mit der kleinen Untereinheit zu ermöglichen. Der in einigen Organismen überdies vorkommende Faktor HypX hat gemäß aktueller Untersuchungen eine Rolle in der CO-Synthese unter Sauerstoff und somit der Sauerstofftoleranz der Hydrogenasematuration (Bürstel, 2013).

Für die Maturation der membrangebundenen Hydrogenase (MBH) werden die zusätzlichen Reifungsfaktoren HoxLOQRTV benötigt (Fritsch *et al.*, 2013). Die Proteine HoxO und HoxQ schützen womöglich die [FeS]-Cluster der kleinen Untereinheit HoxK während der Maturation vor reaktiven Sauerstoffspezies und blockieren das Tat-Signalpeptid, um den Export unreifer Hydrogenase zu verhindern (Schubert *et al.*, 2007). HoxL und HoxV werden bei Sauerstoff-exponierter Reifung für den Einbau der durch HypEF synthetisierten Fe(CN)₂CO-Gruppe in die prämatüre große Hydrogenaseuntereinheit benötigt (Ludwig *et al.*, 2009b). HoxR und HoxT binden in unterschiedlichen Stadien des Maturationsprozesses an die kleine Untereinheit und ermöglichen so eine Reifung auch in Gegenwart von Sauerstoff (Fritsch *et al.*, 2011a).

1.4.5 Genetische Organisation der Hydrogenasen

Die drei bislang gut untersuchten Hydrogenasen von *R. eutropha* sind in zwei Operons auf dem Megaplasmid pHG1 codiert (Schwartz *et al.*, 2003; Pohlmann *et al.*, 2006). Das eine Operon enthält die Strukturgene der MBH, *hoxKGZ*, die Gene aller für [NiFe]-Hydrogenasen benötigten Reifungsfaktoren *hypA1B1F1CDEX* einschließlich *hoxM*, das eine spezifische Endoprotease codiert, sowie die Gene *hoxLOQRTV* für die MBH-spezifische Reifung. Des Weiteren sind in diesem Operon die Gene der regulatorischen Hydrogenase, *hoxBC*, zusammen mit den Genen des dazugehörigen Zweikomponentensystems, *hoxAJ*, vorhanden. Das zweite Operon beherbergt die Strukturgene *hoxFUYH* der SH, das Gen *hoxI*, sowie *hoxW*, das Gen der SH-spezifischen Endoprotease. Dieses Operon enthält auch Kopien der Maturationsgene *hypA2B2F2*.

In *R. eutropha* wurde im Rahmen der Sequenzierung des Megaplasמידs pHG1 ein weiteres Hydrogenaseoperon entdeckt (Schwartz *et al.*, 2003). Es enthält alle typischerweise in einem Operon der Gruppe 5 vorkommenden Gene (siehe Kapitel 1.3; Abbildung 1-4; Constant *et al.*, 2011b). Neben den Strukturgenen *hofKG* und dem Gen *hupD* der spezifischen Endoprotease

wurden auch in zusätzlicher Kopie alle Maturationsgene (*hypF3C2D2E2A3B3*) gefunden (Abbildung 1-4). Wie in allen „Gruppe 5-Operons“ sind auch in *R. eutropha* vier unbekannte ORFs vorhanden. Zusätzlich befindet sich das Gen einer putativen Heptosephosphat-Isomerase im Operon. Die Gruppe 5-Hydrogenase von *R. eutropha* wurde jedoch bislang als inaktiv angesehen, da neben den Aktivitäten von MBH, SH und RH in *R. eutropha* keine weitere Hydrogenaseaktivität gefunden wurde (Kleihues *et al.*, 2000). Eine hochaffine H₂-Aufnahme, die für Gruppe 5-Hydrogenasen postuliert wurde (Constant *et al.*, 2011b), konnte für intakte *R. eutropha*-Zellen zudem nicht beobachtet werden (Conrad *et al.*, 1983).

1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

Das Operon der actinobakteriellen Hydrogenase (AH) wurde im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von *Ralstonia eutropha* beschrieben (Schwartz *et al.*, 2003; Pohlmann *et al.*, 2006). Bislang wurde jedoch keine Aktivität identifiziert, die dieser Hydrogenase zugeordnet werden kann. In dem Stamm *R. eutropha* HF500, in dem die Gene *hoxG*, *hoxH* und *hoxC* der damals bekannten Hydrogenasen deletiert worden waren, wurde mit herkömmlichen Methoden keine Restaktivität nachgewiesen (Kleihues *et al.*, 2000). Daher wurde angenommen, dass das AH-Operon keine funktionale Hydrogenase codiert (Schwartz *et al.*, 2003). Neuere Studien, denen zufolge einige mit der AH eng verwandte Hydrogenasen in *Streptomyces*-Arten für die Aufnahme von H₂ aus der Atmosphäre verantwortlich sind (Constant *et al.*, 2008; Constant *et al.*, 2010), erweckten neues Interesse an der AH in *R. eutropha*.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst geklärt werden, ob die Bildung einer funktionalen Hydrogenase aus dem fraglichen Operon in *R. eutropha* möglich ist. Da angenommen wurde, dass der native Promoter des AH-Operons unter normalen Bedingungen inaktiv ist, sollte das Operon unter die Kontrolle eines starken Promoters gestellt werden, der die Transkription des Operons unter den üblichen Anzuchtbedingungen für *R. eutropha* gewährleistet. Die grundlegende Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb, die Gene der AH zu überexprimieren und nachzuweisen, dass aus den Genen des AH-Operons eine funktionale Hydrogenase gebildet werden kann. Teil der Aufgabenstellung waren zudem Untersuchungen, ob und unter welchen Bedingungen die AH unter ihrem nativen Promoter gebildet wird.

Aufbauend auf das Ergebnis dieser Untersuchungen sollte ein Protokoll zur Reinigung der Hydrogenase etabliert werden, um das Enzym einer biochemischen und spektroskopischen Charakterisierung zugänglich zu machen. Hierzu wurde die *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie als bequeme und schnelle Methode ausgewählt. Am gereinigten Enzym sollten die grundlegenden katalytischen Parameter bestimmt werden. Neben der Suche nach einem geeigneten Elektronenakzeptor für Aktivitätsbestimmungen gehörten die Bestimmungen des Verhaltens der AH bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen, der Affinität gegenüber Wasserstoff und dem gefundenen Elektronenakzeptor sowie des Verhaltens der AH in Gegenwart von Sauerstoff zum Umfang dieser Untersuchungen.

Darüber hinaus war es ein Ziel der Arbeit, mit Hilfe von spektroskopischen Studien die Eigenschaften und Redoxzustände der Cofaktoren und den katalytischen Zyklus der AH am aktiven Zentrum aufklären. Diese Untersuchungen sollten mittels EPR- und FTIR-Spektroskopie im Rahmen eines Kooperationsprojektes durchgeführt werden. Die weitere Zielsetzung beinhaltete die Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse im Rahmen eines zweiten Kooperationsprojektes. Anhand einer Röntgenstruktur der AH sollte abschließend geklärt werden, welche Arten von [FeS]-Clustern in dieser Hydrogenase vorkommen, und welche Aminosäuren selbige koordinieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen BIO-RAD (München), DIFCO (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Restriktionsendonukleasen und andere Nukleinsäure-modifizierende Enzyme lieferten die Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe) und Roche Diagnostics (Mannheim). Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Kommerzielle Kits von Invitex (Berlin), Qiagen (Hilden) und IBA (Göttingen) wurden eingesetzt. Gase lieferte die Firma AirLiquide (Düsseldorf). Deionisiertes und gereinigtes Wasser wurde mit einem MembraPure Aquintus (membraPure, Bodenheim) bei einem spezifischen Widerstand von 18.2 MΩ·cm hergestellt.

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-2 enthält die verwendeten Plasmide. Die Stämme *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), *E. coli* DH5α (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und *E. coli* NEB 10-β (New England Biolabs) wurden für Klonierungen benutzt. *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) diente als Donor für konjugativen Plasmidtransfer in *R. eutropha*. Von *R. eutropha* wurden der Wildtypstamm *R. eutropha* H16 sowie Derivate desselben verwendet, welche mit den Buchstaben HF benannt sind. Alle verwendeten Stämme von *R. eutropha* tragen das Megaplasmid pHG1, sowie zum Teil weitere Plasmide, die durch die Buchstaben pGE gekennzeichnet sind. Die in der Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion spezifisch synthetisiert und sind in Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamname	Relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>R. eutropha</i> :		
H16	Wildtyp, MBH ⁺ , SH ⁺ , RH ⁺ , HoxJ ⁻	DSM428, ATCC17699
HF09	$\Delta rpoN$; MBH ⁻ , SH ⁻	Schink & Schlegel, 1978
HF371	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁺ , AH ⁺	Massanz <i>et al.</i> , 1997
HF798	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$; MBH ⁻ , SH ⁺ , RH ⁻ , AH ⁺	Lauterbach, 2013
HF409	$\Delta hoxA$; MBH ⁻ , SH ⁻	Lenz <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 2-1 (Fortsetzung)

Stammname	Relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
HF500	$\Delta hoxH, \Delta hoxG, \Delta hoxC$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺	Kleihues <i>et al.</i> , 2000
HF579	$\Delta hypA1B1F1CDEX, \Delta hypA2B2F2, \Delta hoxG, \Delta hoxH$; MBH ⁻ , SH ⁻	Buhrke, 2002
HF803	$\Delta hoxH, \Delta hoxC$; MBH ⁺ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺	O. Lenz, nicht veröffentlicht
HF864	$\Delta hoxG, \Delta hoxH, \Delta hoxC, P_{MBH^{-}}-hofK$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺	Diese Arbeit
HF865	$\Delta hoxG, \Delta hoxH, \Delta hoxC, P_{MBH^{-}}-hofK \Delta hofG$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF866	$\Delta hoxG, \Delta hoxH, \Delta hoxC, \Delta hofG$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF867	$\Delta hoxH, \Delta hoxC, \Delta hofG$; MBH ⁺ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF868	$\Delta hoxG, \Delta hoxH, \Delta hofG$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁺ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF869	$\Delta hoxG, \Delta hoxC, \Delta hofG$; MBH ⁻ , SH ⁺ , RH ⁻ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF883	$\Delta fnr3$	Lütte, 2009
HF901	Derivat von HF864, $P_{MBH^{-}}-hofK_{Strep^{++}}$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ^{Strep^{++}}}	Diese Arbeit
HF1035	pGE822 ($P_{SH^{-}Strep}hofK-hofG$) in HF865; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , $StrepAH^{++}$	Diese Arbeit
HF1036	Derivat von HF864, $P_{MBH^{-}}\Delta hofK \Delta hofG$; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁻	Diese Arbeit
HF1038	pGE822 ($P_{SH^{-}Strep}hofK-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , $StrepAH^{++}$	Diese Arbeit
HF1040	pGE827 ($P_{SH^{-}Strep}hhyS-hhyL$ aus <i>S. avermitilis</i>) in HF1036	Diese Arbeit
HF1041	pGE828 ($P_{SH^{-}Strep}hhyS-hhyL$ aus <i>M. smegmatis</i>) in HF1036	Diese Arbeit
HF1048	pGE831 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35S)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35S})	Diese Arbeit
HF1049	pGE832 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35C)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35C})	Diese Arbeit
HF1050	pGE833 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35H)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35H})	Diese Arbeit
HF1051	pGE834 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35G)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35G})	Diese Arbeit
HF1052	pGE835 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35A)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35A})	Diese Arbeit
HF1053	pGE836 ($P_{SH^{-}Strep}hofK(D35N)-hofG$) in HF1036; MBH ⁻ , SH ⁻ , RH ⁻ , AH ⁺⁺ (HofK _{D35N})	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> :		
DH5 α	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109	F' <i>traD36 lacI^q</i> , $\Delta(lacZ)$ <i>M15 proA⁺B⁺/e14⁻ (McrA⁻)</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>thi gyrA96</i> (Nal ^r) <i>endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺) <i>relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
NEB 10- β	<i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>fhuA lacX74 galK</i> (ϕ 80 $\Delta(lacZ)$ M15) <i>mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str ^R) $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$	New England Biolabs
S17-1	Tra ⁺ <i>recA</i> , <i>pro th</i> , <i>hsdR</i> chr:RP4-2	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tabelle 2-2: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Relevante Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
pET24a	Km ^r P ₇₇ Expressionsvektor	Novagen
pLO1	Km ^r <i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	Lenz <i>et al.</i> , 1994
pCH#2588	Derivat von pCM62 (Marx & Lidstrom, 2001); Tet ^r P _{SH} <i>F1ori</i> M13fwd <i>lacZα</i> ColE1 <i>ori</i>	J. Hamann, O. Lenz, nicht veröffentlicht
pCH1676	P _{MBH} mit 0.8 kb der Stromaufwärtsregion des AH-Operons und dem 5'-Ende von <i>hofK</i> als flankierende Sequenzen in pET24a	Diese Arbeit
pGE814	2898bp EcoRV/SmaI-Fragment aus pCH1676 in pLO1 x PmeI	Diese Arbeit
pGE815	3325bp XbaI-Fragment (PCR) mit ' <i>hofK-hofG-PHG066</i> ' in pLO1 x XbaI	Diese Arbeit
pGE816	In-Frame-Deletion eines 1131bp SexAI-Fragmentes aus <i>hofG</i> in pGE815	Diese Arbeit
pGE817	1138bp NdeI/MluI-Fragment (' <i>hofK-Strep</i> ') und 1059bp MluI/XbaI-Fragment (<i>hofG</i> ') nacheinander in pLO1	Diese Arbeit
pGE818	pCH#2588 mit zusätzlichen SpeI-Schnittstellen nach AflIII- Schnittstelle und vor BglII-Schnittstelle	Diese Arbeit
pGE819	1,1kb-PCR-Fragment (<i>Strep-hofK</i>) x PciI/SacI in pGE818 xNcoI/SacI	Diese Arbeit
pGE822	1,8kb-PCR-Fragment (<i>hofG</i>) xXbaI/SacI in pGE819 x XbaI/SacI	Diese Arbeit
pGE825	1,2kb-PCR-Fragment aus pCH1676 (upstream-P _{MBH} - <i>hofK</i> ') xSacI/BclI in pGE816 xSacI/BclI	Diese Arbeit
pGE827	2,9kb-PCR-Produkt (<i>hhyS-hhyL</i> aus <i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i>) in pGE822 x NheI/SacI (InFusion Rekombination)	Diese Arbeit
pGE828	2,9kb-PCR-Produkt (<i>hhyS-hhyL</i> aus <i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>) in pGE822 x NheI/SacI (InFusion Rekombination)	Diese Arbeit
pGE831	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35S)	Diese Arbeit
pGE832	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35C)	Diese Arbeit
pGE833	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35H)	Diese Arbeit
pGE834	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35G)	Diese Arbeit
pGE835	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35A)	Diese Arbeit
pGE836	pGE822 mit Basenaustausch in <i>hofK</i> (D35N)	Diese Arbeit

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide bzw. Primer

Nummer	Primernamen*	Basensequenz**
1	P _{MBH} -NdeI_rev	TT <u>CATATg</u> CTGTCTCCTAATTTC
2	P _{MBH} -XbaI_fwd	GCTCTAGAGCTAGCGCGAGGCGACGGTC
3	upstream-BglII_fwd	TGAGATCTACAGCAAGCCAAGCGGATAC
4	upstream-XbaI_rev	AGTCTAGACGCAGAAAGTCACGTTTGCT
5	<i>hofK770</i> -HindIII_rev	GCAGCCAAGCTTGACAA
6	<i>hofK0</i> -NdeI_fwd	TT <u>catATG</u> GCAGAACAGGCCGTTCCCTAT
8	<i>hofK270</i> -XbaI_fwd	<u>gctctagac</u> TCGTGCTGGTGTGTTGAAGG
9	<i>PHG067</i> -XbaI_rev	<u>catctaga</u> AGCTCGCATTGCGCGTAGTC
12	pre- <i>hofK</i> -NdeI_fwd	<u>gccatag</u> CGGGTCATTGAGAGTCAAAG
13	<i>hofK</i> Ende- <i>Strep</i> Mlul_rev	<u>ctacgcgtt</u> tacttctcgaactgcgggtggctccag <u>ctagc</u> TCCGCGG TAGCCGGTAGTGAGAACTGG
14	post- <i>hofK</i> Mlul_fwd	<u>taacgcgt</u> GGAACGCGCATTCTAAGATTG
15	<i>hofG1020</i> -XbaI_rev	<u>cgtctaga</u> TCGTTCTTGACGGAGGTTTC
35	P _{SH} -AflIII-SpeI_fwd	<u>ccgacatgt</u> actaGTGCTGGCACAAG
36	pLO11-BglII-SpeI_rev	<u>gccagatct</u> <u>actag</u> TGAGCTCTCCCATGG
37	<i>hofK0</i> -PciI- <i>Strep</i> _fwd	<u>gacacatgt</u> ggagccaccgcagttcgaaaagg <u>gctag</u> CATGGCA GAACAGGCCGTTCCCTATGG
38	post- <i>hofK</i> -XbaI- SacI_rev	<u>caagagctcgtc</u> TAGAATGCGCGTTCC
40	<i>hofG0</i> -XbaI_fwd	CGCGCATTCTA <u>ga</u> ATTTGGAGGTGG
44	<i>hofG</i> Ende-SacI_rev	<u>gtagagctc</u> GCACCGCTCATCAGTG
65	<i>hofK30</i> -BclI_rev	<u>gtcttgatca</u> TGCGCCCATAGGGAACGGCCTG
66	upstream-SacI_fwd	<u>gttcgagctc</u> TACAGCAAGCCAAGCGGATAC
72	<i>Sav-hhyS0</i> - InFusion_fwd	<u>gttcgaaaaggctag</u> CATGACTGCGGCAACGC
73	<i>Sav-hhyL</i> Ende- InFusion_rev	<u>gcagatctactagt</u> CGATACCGCGCTCATCCGCCAG
74	<i>Msmeg-hhyS0</i> - InFusion_fwd	<u>gttcgaaaaggctagc</u> ATGCCAACGGAGGCTGCAGTC
75	<i>Msmeg-hhyL</i> Ende- InFusion_rev	<u>gcagatctactagt</u> GGGCGCCATGCGTCAGTC
84	<i>hofK110</i> -D35S-BsmBI- BseRI_rev	TG <u>GAgACGGAgga</u> GCCGTCGCAGCCAAGACC
85	<i>hofK110</i> -D35C- BsmBI_rev	TG <u>GAgACGGAgca</u> GCCGTCGCAGCCAAGACC
86	<i>hofK110</i> -D35H- BsmBI_rev	TG <u>GAgACGGAg</u> tgGCCGTCGCAGCCAAGACC
87	<i>hofK110</i> -D35G- BsmBI_rev	TG <u>GAgACGGAg</u> ccGCCGTCGCAGCCAAGACC
88	<i>hofK110</i> -D35A- BsmBI-NarI_rev	TG <u>GAgACGGAg</u> gcGCCGTCGCAGCCAAGACC

Tabelle 2-3 (Fortsetzung)

Nummer	Primernamen*	Basensequenz**
89	<i>hofK110-D35N-BsmBI_rev</i>	TG <u>G</u> Ag <u>ACG</u> GAattGCCGTCGCAGCCAAGACC
105	<i>hoxK_fwd</i>	GCAGGCAGCCAAACCTAATC
106	<i>hoxK_rev</i>	CGTGGATGCGCTGGCTATA
151	<i>gyrB_fwd</i>	GCCTGCACCACCTTGTCTTC
152	<i>gyrB_rev</i>	TGTGGATGGTGACCTGGATCT
381	<i>hypC2_fwd</i>	GGTATCCCCGGACAGATCCT
382	<i>hypC2_rev</i>	CGATGAAGGCGATATTGATCAG
391	<i>hofK_fwd</i>	CGAAGGTGCATCTGCATAACC
392	<i>hofK_rev</i>	AATAGCCCTCGCCGTTGAT
441	<i>hoxF_fwd</i>	GCCCGGCACGTTCAAG
442	<i>hoxF_rev</i>	CATACGCGGCGATAACCATT

*Die Namen beinhalten den Ort der Bindestelle und die relevanten Restriktionsschnittstellen. Die Nummer hinter einem Gen deutet die Entfernung der Bindestelle vom 5'-Ende des Gens an.

**Von der Templatsequenz abweichende Basen sind in Kleinbuchstaben notiert, relevante Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

2.3 Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle verwendeten Gefäße, Geräte, Lösungen und Medien, insbesondere für Kultivierungen von Bakterien, deren Lagerung und alle Arbeiten mit Nukleinsäuren, wurden – soweit hitzestabil – in einem Autoklaven unter Dampfdruck sterilisiert und vorhandene DNasen inaktiviert (121 °C, 20 min). Die Geräte und Glasgefäße wurden teilweise auch trocken sterilisiert (180 °C, 6 h). Antibiotika und andere hitzeempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm) und zu sterilen, abgekühlten Medien zugegeben.

2.4 Kultivierung von Bakterien

2.4.1 Nährmedien

E. coli-Stämme wurden in LB-Medium (Bertani, 1951) oder SOC-Medium kultiviert. NB-, LSLB-Sacc- (Lenz *et al.*, 1994) oder Fructose- (FN) bzw. Fructose-Glycerin-Minimalmedien (FGN oder FGN_{mod}; Friedrich, 1982; Goris *et al.*, 2011) wurden für heterotrophes Wachstum von *R. eutropha*-Stämmen verwendet. Autotrophes Wachstum erfolgte in Mineralmedium (Aut). Die Zusammensetzungen der Kulturmedien sind in Tabelle 2-4 aufgeführt. Für feste Medien wurden zusätzlich 1,5 % [w/v] Agar-Agar (Roth) bei Komplexmedien bzw. 1,5 % [w/v] Reinst-Agar (Difco Bacto Agar) bei Minimalmedien eingesetzt. Antibiotika wurden gemäß der im zu kultivierenden Stamm ausgebildeten Resistenzen in den in Tabelle 2-5 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt. Für Fest- und Flüssigmedien wurden jeweils gleiche Konzentrationen an Antibiotikum gewählt.

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Kulturmedien

Name des Mediums	Bestandteil	Konzentration
LB-Medium	Trypton	1 % [w/v]
	Hefeextrakt	0,5 % [w/v]
	NaCl	0,5 % [w/v]
SOC-Medium	Trypton	2 % [w/v]
	Hefeextrakt	0,5 % [w/v]
	Glucose	20 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
LSLB-Sacc-Medium	Trypton	1 % [w/v]
	Hefeextrakt	0,5 % [w/v]
	NaCl	0,25 % [w/v]
	Saccharose	15 % [w/v]
NB-Medium	Nutrient Broth (Difco)	0,8 % [w/v]
Aut-Medium	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	25 mM
	KH ₂ PO ₄	11 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,81 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,068 mM
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O (aus 0,5 %-iger Stammlösung in 0,1 M HCl)	18 µM
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,001 mM
	NH ₄ Cl	37,4 mM
FN-Medium	zusätzlich zu Aut-Medium: Fruktose	0,4 % [w/v]
FGN-Medium	zusätzlich zu Aut-Medium: Fruktose	0,2 % [w/v]
	Glycerin	0,2 % [v/v]
FGN _{mod} -Medium	zusätzlich zu Aut-Medium: Fruktose	0,05 % [w/v]
	Glycerin	0,4 % [v/v]

Tabelle 2-5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Kulturmedium	
		<i>E. coli</i>	<i>R. eutropha</i>
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml	400 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 80 % [v/v] Ethanol	10 µg/ml	10 µg/ml

2.4.2 Bestimmung des Zellwachstums

Das Wachstum von Zellen in Flüssigkulturen wurde anhand der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurden in regelmäßigen, dem zu erwartenden Wachstumsverlauf angemessenen Zeitintervallen Proben genommen und die optische Dichte (OD) im Photometer (U-2000, Hitachi) gegen H16-Puffer bzw. LB-Medium als Nullwert bestimmt. Die Messung erfolgte in 1 ml-Glasküvetten. Für Kulturen von *R. eutropha* wurde die OD₄₃₆ und für Kulturen von *E. coli* die OD₆₀₀ gemessen. Die Zellsuspensionen wurden dafür auf gemessene Extinktionswerte unter 0,4 verdünnt.

2.4.3 Zellkultivierung

Die Kultivierung von Zellen in Flüssigmedien erfolgte in Erlenmeyer-Kolben, ab einem Volumen von 100 ml Kultur wurden Kolben mit Schikanen verwendet. Kulturvolumina bis 100 ml wurden aus einer Glycerin-Stammkultur oder von einer Agarplatte mit einer Einzelkolonie beimpft. Größere Kulturvolumina wurden aus kleineren Vorkulturen im Verhältnis 1:100 bis 1:40 beimpft. Die Kulturen wurden auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm (großer Schüttler) oder 120 rpm (kleiner Schüttler) inkubiert. Kulturen von *E. coli* wurden bei 30 °C oder 37 °C angezogen, Kulturen von *R. eutropha* wuchsen bei 30 °C. Vorkulturen von *R. eutropha* wuchsen in FN-Medium; Hauptkulturen von *R. eutropha* wurden unter Standardbedingungen in FGN-Medium bei einer Befüllung des Kolbens mit 20 % des Nennvolumens bis zu einer OD₄₃₆ von 11±1 kultiviert. Kultivierungen mit dem Ziel einer möglichst hohen Hydrogenaseproduktion der Zellen wurden in FGN_{mod}-Medium bei einer Befüllung des Kolbens mit 80 % des Nennvolumens ebenfalls bis zu einer OD₄₃₆ von 11±1 durchgeführt. Für Experimente zum lithoautotrophen Wachstum von *R. eutropha* wurden verschiedene Stämme auf Aut-Agarplatten bei 30 °C unter einer Atmosphäre aus 3 % H₂, 10 % CO₂ und 10 % O₂ in N₂ unter regelmäßigem Neubegasen inkubiert. Mixotrophe Kulturen wuchsen in derselben Atmosphäre, aber auf Agarplatten, die zusätzlich Glycerin als schlecht verstoffwechselte Kohlenstoffquelle enthielten.

2.4.4 Zellernte

Kulturen unter 3 ml Volumen wurden in einer Tischzentrifuge geerntet (Heraeus Fresco 21, Thermo Electron, 4 °C, 14800 x g, 5 min). Kulturvolumina bis 50 ml wurden in Falcontubes geerntet (4 °C, 3000 x g, 15 min; Megafuge 1.0 oder Megafuge 2.0, Heraeus Instruments). Größere Kulturen wurden mit einer RC6+-Zentrifuge (Sorvall) in 500 ml-Bechern (4 °C, 6000 x g, 15 min; Rotor SLA-3000) oder 1 l-Bechern (4 °C, 6750 x g, 12 min; Rotor F9S-4x1000y, Thermo Fisher) geerntet. Kulturen und Zellpellets wurden während der Ernte gekühlt. Das Nassgewicht der Pellets wurde bestimmt. Die Zellpellets wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.4.5 Konservierung von Bakterienstämmen

Bakterienkulturen wurden auf Agarplatten bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Zur längeren Konservierung wurden wichtige Bakterienstämme in Glycerin-Dauerkulturen bei -80 °C gelagert. Dazu wurde jeweils eine Einzelkolonie einer Agarplatte des zu konservierenden Stammes im geeigneten Kulturmedium bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase kultiviert, in einem sterilen 2 ml-Cryoröhrchen mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 15 % [v/v] versetzt und bei -80 °C eingefroren. Aus diesen Dauerkulturen konnte später Zellmaterial zur erneuten Kultivierung der konservierten Stämme entnommen werden.

2.5 Zellfraktionierung und Proteinreinigung

2.5.1 Präparation des Rohextrakts, der löslichen Fraktion und der Membranfraktion

Die Präparation von Zellextrakten aus *R. eutropha* erfolgte durchgehend bei 4 °C oder auf Eis. Frisch geerntete oder bei -80 °C gelagerte Zellen wurden in 1,5-2 ml pro 1 g Zellmasse Phosphatpuffer (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,0) resuspendiert. Der Zellsuspension wurde EDTA-freier Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) und DNase I zugesetzt. Volumina bis 80 ml wurden in zwei Passagen in einer French-Press (Digi-F-Press, G. Heinemann) bei 4 °C mit ca. 1200 bar (18000 PSI) aufgeschlossen. Für größere Volumina wurde eine automatisierte French-Press (1,7 kbar, 4 °C; Constant Cell Disruption Systems) verwendet. Wenn Membranextrakte gewonnen werden sollten wurden Zelltrümmer mittels niedertouriger Zentrifugation (4000 x *g*, 30 min) entfernt und im Anschluss die Membranen durch Ultrazentrifugation sedimentiert (96000 x *g*, 45 min; Combi Plus Ultrazentrifuge, Sorvall). Ansonsten wurden alle unlöslichen Zellbestandteile direkt nach dem Aufschluss durch Ultrazentrifugation sedimentiert (96000 x *g*, 45 min; Combi Plus Ultrazentrifuge, Sorvall), und die lösliche Fraktion weiter verwendet. Bei der Präparation von Membranextrakten wurde die durch Ultrazentrifugation sedimentierte Fraktion in einem geeignetem Volumen Phosphatpuffer resuspendiert und erneut durch Ultrazentrifugation (100000 x *g*, 45 min) sedimentiert. Die so gewaschenen Membranen wurden in einem geeigneten Volumen Phosphatpuffer resuspendiert und homogenisiert.

2.5.2 Affinitätschromatographie

Mit einem *Strep*-Tag II modifizierte Varianten der AH wurden durch Affinitätschromatographie gereinigt. Der *Strep*-Tag II ist ein Oktapeptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), dessen hohe Bindungsaffinität zu Streptavidin (Schmidt *et al.*, 1996) und der optimierten Variante *Strep*-Tactin (Voss & Skerra, 1997) für die selektive Isolierung eines mit dem *Strep*-Tag II modifizierten Proteins aus Zellextrakten eingesetzt wird.

Für eine schnelle Reinigung des AH_{*Strep*}-Proteins, bei der teilweise drei Verunreinigungen im Isolat verblieben, wurde der lösliche Extrakt auf eine *Strep*-Tactin Superflow-Säule (IBA) aufgetragen. 2 ml Bettvolumen wurde für 25 ml löslichen Extrakt eingesetzt. Die beladene Säule wurde mit 10 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl) gewaschen; das AH_{*Strep*}-Protein wurde mit 6 Bettvolumen Elutionspuffer (Waschpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin) von der Matrix eluiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation in einem Zentrifugalfilter konzentriert (3300 x *g*, 4 °C, 20 min; Amicon Ultra Ultracel 30K, Millipore). Das erhaltene Konzentrat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Um hochreines AH_{*Strep*}-Protein zu erhalten wurde der lösliche Extrakt vor dem Auftrag auf die *Strep*-Tactin Superflow-Säule (1 ml Bettvolumen für 25 ml Extrakt; IBA) mit verdünnter KOH auf pH 7,2 eingestellt. Die beladene Säule wurde mit 10 Bettvolumen Waschpuffer II (50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, 150 mM NaCl) gewaschen, die Waschfraktion wurde im Anschluss mit verdünnter KOH auf pH 7,2 eingestellt und auf eine zweite *Strep*-Tactin Superflow-Säule mit identischem Bettvolumen geladen. Nach einem Waschschrift mit 10 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl) wurde das reine AH_{*Strep*}-Protein

durch Elution mit 6 Bettvolumen Elutionspuffer (Waschpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin) erhalten. Das Eluat wurde durch Zentrifugation in einem Zentrifugalfilter konzentriert (3300 x g, 4 °C, 20 min; Amicon Ultra Ultracel 30K, Millipore). Das erhaltene Konzentrat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Isolation des AH_{Strep}-Proteins ohne verbleibende Nukleotide

Um das AH_{Strep}-Protein ohne Nukleotidverunreinigungen zu isolieren wurde vor dem Zellaufschluss neben der stets verwendeten DNase zusätzlich RNase A in den Aufschlusspuffer zugesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wie zuvor beschrieben. In den hierbei erhaltenen konzentrierten Eluaten wurden kaum noch Nukleotide gefunden.

2.5.4 Anionenaustauschchromatographie

Um die Nukleotide aus bereits isolierten Proteinproben abzutrennen wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierzu wurde eine 5 ml-Säule mit dem schwachen Anionenaustauscher Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-Sephacel) an einem ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Steuerung und Auswertung von Chromatographieläufen wurde mit der Software Unicorn (GE Healthcare) durchgeführt. Um verschiedene Fraktionen zu eluieren wurden Salzkonzentrationen zwischen 0 mM und 2 M NaCl (in 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl, pH 7,4) eingesetzt. Die Elution erfolgte zunächst mit einem Salzgradienten von 100-250 mM NaCl (5 Bettvolumen), gefolgt von einem Hochsalzschrift mit 2 M NaCl (3 Bettvolumen). Die Elution wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt, es wurden Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Die Fraktionen, in denen signifikante Absorption bei 280 nm beobachtet wurde, wurden für jedes Absorptionsmaximum jeweils vereint und sofern möglich durch Zentrifugation in einem Zentrifugalfilter konzentriert (3300 x g, 4 °C, 20 min; Amicon Ultra Ultracel 30K, Millipore).

2.6 Probenanalytik

2.6.1 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

Die Konzentrationen von Proteinen in Proben wurden mit der BCA-Methode mit Rinderserum-Albumin (BSA) als Standard bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Hierzu wurde das BCA Protein Assay-Kit (Thermo Scientific) verwendet. Die Reaktionslösung wurde aus den Komponenten „BCA Reagent A“ (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und „BCA Reagent B“ (4 % Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 frisch angesetzt. Je 25 µl geeignet verdünnter Proben und einer Standardreihe von 0-1 mg/ml BSA wurden in einer 96-Well Platte mit 200 µl der frisch angesetzten Reaktionslösung versetzt und abgedeckt für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde im Anschluss in einem Plattenleser (Spektramax 340, Molecular Devices) bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve ermittelt.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in Proben enthaltenen Proteine wurden durch denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden Minigele (10 x 8

x 0,1 cm) in der Vertikalkammer M1005.1 der Firma cti verwendet. Die Konzentration des unvernetzten Acrylamids lag bei 4 % für die Sammelgele und bei 12 % für die Trenngele. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 5 x Probenpuffer (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % [w/v] SDS, 40 % [v/v] Glycerin, 5 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt und für 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Die Gele wurden mit maximal 20 μ l Probe pro Tasche beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 45 mA pro Gel in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS) für ca. 1 h. Als Molekulargewichtstandard wurde „Precision Plus Protein Standard Dual Color“ (Biorad) verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden für ca. 15 min mit Färbelösung (1 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue G-250 in 33 % [v/v] Methanol) behandelt und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung (25 % [v/v] Methanol, 5 % [v/v] Eisessig in H₂O) inkubiert.

2.6.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot und Antikörperfärbung

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch Elektrophorese aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (BA 85, Schleicher & Schüll) übertragen. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren mit Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin; pH 8,3) bei 0,7 A pro Gel für 30 min.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für mindestens 60 min in Blockpuffer (5 % [w/v] Magermilchpulver in TBST-Puffer [20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20; pH 7,5]) geschwenkt und 3 x 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Zur Sichtbarmachung von Proteinen mit Strep-tag II wurde die Membran für 60 min mit monoklonalem Antikörper aus Maus (StrepMABClassic, IBA; 1:200 in TBS [20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl; pH 7,5]) inkubiert und anschließend 3 x 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran mit Anti-Maus-Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Bio-Rad; 1:10000 in TBST für weitere 60 min inkubiert und mit TBS-Puffer gewaschen. Die mit einem Strep-Tag versehenen Proteine wurden mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) durch eine Farbreaktion mit der Alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht. Hierzu wurden Lösungen der Färbereagenzien BCIP (50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT; 100 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) im Verhältnis 1:2000 zum Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂; pH 9,5) gegeben. Der Färbeansatz wurde bis zum Erscheinen violetter Banden im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit H₂O gestoppt.

2.6.4 Aufnahme von UV/Vis-Absorptionsspektren

UV/Vis-Spektren wurden im Zweistrahl-UV/Vis-Spektrometer Cary 5000 (Varian) aufgenommen. Die Messungen wurden in 100 μ l-Quarzküvetten (Varian, optische Weglänge 1 cm) bei Raumtemperatur durchgeführt, hierbei wurde ein Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 600 nm/min untersucht. Als Leerwert diente der Puffer der untersuchten Probe. Die Proben wurden im oxidierten Zustand wie nach der Reinigung erhalten eingesetzt.

2.6.5 Größenbestimmung durch Gelpermeationschromatographie

Das Molekulargewicht der nativen AH wurde mittels Gelpermeationschromatographie näherungsweise bestimmt. Hierzu wurden 500 μ g gereinigtes Protein auf einer

Gelfiltrationssäule (Superdex 200 HR10/30, Amersham Pharmacia, ca. 20 ml Säulenvolumen) mit Phosphatpuffer als Eluent (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 150 mM NaCl) in einem ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Die Steuerung und Auswertung von Chromatographieläufen wurde mit der Software Unicorn (GE Healthcare) durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,25 ml/min; das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Auftrennung wurde anhand der Absorption bei 280 nm (Absorption von Proteinbestandteilen) und 405 nm (Absorption der [FeS]-Cluster) verfolgt. Die Molekulargewichte der erhaltenen Absorptionsmaxima wurden durch Vergleich mit einer Standardkurve aus den Proteinen Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Rinderserum-Albumin (66 kDa) ermittelt. Die Zusammensetzung der proteinhaltigen Fractionen wurde durch SDS-PAGE analysiert.

2.6.6 Metallbestimmung

Der Gehalt der Metalle Fe, Ni, Cu und Zn in gereinigten Proteinproben wurde durch optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES; Optima 2100 DV, Perkin Elmer) unter Verwendung einer Multi-Element Standardlösung XVI (Merck) als Referenz quantifiziert. Die Bestimmungen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Silke Leimkühler, Universität Potsdam, durchgeführt.

2.7 Bestimmung der Genexpression mittels RT-qPCR

2.7.1 RNA-Isolierung und Qualitätsanalyse

Für Quantifizierungen der Transkriptmengen mittels RT-qPCR wurden verschiedene Stämme von *R. eutropha* in unterschiedlichen Medien bis zu einer OD_{436} von 1 oder 8 kultiviert. Die Stoffwechselvorgänge in den Zellen wurden zum Zeitpunkt der Ernte durch Zugabe von zwei Volumen 50 % [v/v] Methanol (-80 °C) gestoppt. Die Zellen aus ca. 5 ml Kultur wurden sedimentiert und zur Stabilisierung der RNA mit 0,5 ml RNAprotect (Qiagen) gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Ribopure Bacteria-Kit (Ambion) nach Herstellervorschrift isoliert und falls nicht sofort weiter verwendet bei -80 °C gelagert. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der RNA wurden mit Hilfe eines NanoDrop-Spektrophotometers (ND-1000, Peqlab) bestimmt. Die Integrität der RNA mit einem RNA 6000 Nano Assay-Chip auf einem Bioanalyzer 2100 (Agilent) nach Vorschrift des Herstellers überprüft und mit der Software 2100 Expert (Agilent) ausgewertet.

2.7.2 In-vitro Transkription

Für absolute Quantifizierungen der Genexpression wurden Fragmente von *hofK* und *hoxK* durch PCR mit den Primern 391+392 bzw. 105+106 amplifiziert und *in-vitro* transkribiert. Hierzu wurden in einem 20 μl -Ansatz 1 x Reaktionspuffer, 0,7 μl RNA-Polymerase (50 U/ μl), 4 mM Nukleotidtriphosphat-Mix, 0,4 μl RNase-Inhibitor, 40 mM Dithioerythritol (DTE) und 5 μl des zuvor amplifizierten Fragments als Templat in ddH_2O eingesetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die eingesetzte DNA mit dem TURBO-DNA-free-Kit (Ambion) nach Herstellervorschrift verdaut. Die RNA wurde mit 2,5 M LiCl und 30 min Inkubation bei -20 °C gefällt, mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und die sedimentierte RNA in RNase-freiem ddH_2O gelöst. Für die anschließende Reverse Transkriptase-Reaktion wurden 100 ng der so

erhaltenen RNA mit 1,9 µg Hefe-t-RNA gemischt, um in der RT-qPCR vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

2.7.3 Reverse-Transkriptase-Reaktion

2 µg Gesamt-RNA jeder Probe wurden mit Hilfe des High Capacity RNA-to-cDNA-Kits (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben revers transkribiert.

2.7.4 Real-Time- quantitative PCR (RT-qPCR)

Die gemäß Abschnitt 2.7.3 gewonnene cDNA wurde als Templat in Real-Time-qPCR-Analysen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt. Die Analysen wurden mit einem 7500 Fast PCR Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 5 µl mit 5 ng cDNA, 1 x SYBR green Reaktionsmix und 500 nM jedes Primers durchgeführt. Das verwendete Temperaturprofil bestand aus 2 min bei 50 °C und 20 s bei 95 °C als initiale Schritte, gefolgt von 40 Zyklen mit 3 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C. Folgende für eine Annealingtemperatur von 58-60 °C optimierte Primer wurden für die Amplifikation spezifischer Genabschnitte verwendet: Primer 105+106 für *hoxK*, 151+152 für *gyrB*, 381+382 für *hypC2*, 391+392 für *hofK*, 441+442 für *hoxF* (siehe Tabelle 2-3). Die amplifizierten Fragmente hatten Längen von 80 bis 200 Basenpaaren. Die PCR-Amplifikationseffizienz betrug für alle Primerpaare 100±10 %. Die Einheitlichkeit der Produkte jeder PCR wurde durch Bestimmung der Dissoziationskurven überprüft. Relative Quantifizierungen der Genexpression wurden mit der ddCt-Methode durchgeführt. Das Gen *gyrB*, welches in *R. eutropha* konstitutiv exprimiert wird, wurde hierbei als endogene Kontrolle verwendet. Für absolute Quantifizierungen wurden von durch in-vitro-Transkription und reverse Transkription eines bekannten Fragments gewonnener cDNA bekannter Konzentration Verdünnungsreihen angefertigt (Verdünnungen 1:5¹ - 1:5⁵) und die zu quantifizierenden Proben mit diesen verglichen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software 7500 FastSDS (Applied Biosystems).

2.8 Messung der Hydrogenaseaktivität

2.8.1 Gaschromatographie mit lebenden Zellen

Die Wasserstoffaufnahme lebender Zellen aus dem Überstand von Flüssigkulturen wurde mittels Gaschromatographie bestimmt. Hierfür wurden verschiedene Stämme von *R. eutropha* in FGN-Medium für 48 h bis zu einer OD₄₃₆ von ca. 10 kultiviert. Das Volumenäquivalent zu 1000 OD-Einheiten (entspricht ca. 100 ml, 1000 OD × ml = 100 ml × OD 10) wurde in einer gasdichten Serumflasche mit H16-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 115 ml eingestellt. Die Kulturen wurden unter einer Atmosphäre von 1,03 l Luft oder N₂ bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert (Verhältnis Überstand zu Kultur 9:1). Je nach experimentellem Ansatz wurden dem Überstand 800 ppm H₂ (ca. 32 µM), 0,3 % H₂ (ca. 120 µM) oder 2 % H₂ (ca. 800 µM) zugegeben; die Konzentration von H₂ im Überstand wurde anschließend über mehrere Stunden in Intervallen von 30-60 min durch thermische Leitfähigkeit in einem Gaschromatograph (GC-2014; Shimadzu) bestimmt. Hierzu wurde jeweils 1 ml des Überstandes mit einer gasdichten Spritze (Hamilton) aus der Serumflasche entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Eine Eichgerade wurde aus den

Peakflächen erstellt, die bei der Injektion verschiedener Volumina H_2 erhalten wurden. Um beim Injektionsprozess auftretende Ungenauigkeiten zu umgehen wurden die Peakflächen von H_2 auf eine konstante Peakfläche von N_2 normalisiert. Das Detektionslimit lag bei etwa 12 ppm H_2 (0,5 μM).

2.8.2 CN-PAGE mit anschließender Hydrogenase-Aktivitätsfärbung

Die H_2 -Aufnahmeaktivität der AH wurde in durch CN-PAGE aufgetrennten Proben im Gel durch Aktivitätsfärbung nachgewiesen. Hierzu wurden native Gele mit einem Gradienten von 4-15 % Acrylamid eingesetzt (ca. 15 cm x 12 cm x 1,5 mm; Puffer: 90 mM Tris, 80 mM Borsäure, 3 mM EDTA = TBE-Puffer). Lösliche Extrakte oder gereinigte Proteinproben (20 μg bei gereinigtem Protein, 500-1000 μg bei Extrakten) wurden vor dem Auftrag mit nativem Probenpuffer versetzt (0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 40 % [v/v] Glycerin in TBE). Die Auftrennung erfolgte mit 200 V für 15 h (3000 V x h) in TBE-Puffer in einer SE600-Elektrophoresekammer (Hoefer) bei 4 °C. Anschließend wurden die Gele in gasdichte Serumflaschen mit Puffer (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7,0) überführt und für ca. 30 min mit H_2 begast. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 0,15 mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und teilweise 0,25 mM Phenazinmethosulfat (PMS) gestartet. Nach etwa 3 h Inkubation bei 37 °C wurden Hydrogenaseaktivitäten als blauschwarze Banden sichtbar.

2.8.3 Spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung

Zur Quantifizierung der H_2 -Oxidationsaktivität von gereinigtem AH_{strep} -Protein wurde ein spektrophotometrischer Assay mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) als artifizieller Elektronenakzeptor eingesetzt. Die Aktivität der AH wurde anhand der Reduktion von NBT bei 593 nm in einem UV/Vis-Spektrophotometer (Cary 50, Varian) verfolgt. Dabei entspricht 1 Unit Enzymaktivität der Oxidation von 1 μmol H_2 und der Reduktion von 1 μmol NBT pro Minute und Milligramm Enzym. Der Assay wurde routinemäßig in H_2 -gesättigtem Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 75 μM NBT bei 30 °C durchgeführt. Für eine Messung wurden 1,9 ml H_2 -gesättigter, auf 30 °C temperierter Puffer in eine 3 ml-Anaerobenküvette vorgelegt, mit 75 μM NBT versetzt und ca. 1 min mit H_2 nachbegast, sodass der Reaktionsansatz unter einer H_2 -Atmosphäre stand. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1-10 μl einer gereinigten Proteinprobe gestartet. Für die Bestimmung der Akzeptorspezifität der AH wurden verschiedene Elektronenakzeptoren eingesetzt und deren eventuelle Reaktion mit der AH bei spezifischen Wellenlängen verfolgt. Die Akzeptoren und deren spezifische Wellenlängen sind in Tabelle 3-2 (Kapitel 3.6.1.1) aufgeführt. Messungen wurden zudem bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt, wobei folgende Puffer eingesetzt wurden: 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 für pH 5,5-8, 50 mM Tris/HCl für pH 8-10, 50 mM Capso [3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-Propansulfonsäure]/HCl für pH 9-12. Für Bestimmungen der kinetischen Parameter wurden die NBT-Konzentration, die H_2 -Konzentration und die Reaktionstemperatur variiert. Die H_2 -Konzentrationen in der Reaktionslösung wurden hierbei durch Mischung variabler Anteile H_2 - und N_2 -gesättigten Puffers eingestellt. In diesem Fall wurde die Reaktionslösung nicht mit H_2 nachbegast. Die Enzymaktivität der AH konnte mit Hilfe der spezifischen Extinktionskoeffizienten von NBT (siehe Tabelle 3-3, Kapitel 3.6.1.2) berechnet werden.

2.8.4 Amperometrische Aktivitätsbestimmung

Amperometrische Bestimmungen der H_2 -Oxidationsaktivität wurden an einer für die Messung von H_2 modifizierten Clark-Elektrode (Oxygraph, Hansatech Instruments)

vorgenommen (Wang *et al.*, 1971). Es wurde die identische Reaktion wie in Abschnitt 2.8.3 anhand des wasserstoffabhängigen Potentials verfolgt. 1 Unit Enzymaktivität entspricht der Oxidation von 1 μmol H_2 und der Reduktion von 1 μmol NBT pro Minute und Milligramm Enzym. Die Reaktion wurde mit 75 μM NBT als Elektronenakzeptor und einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt 1,3 ml H_2 - und ggf. O_2 -gesättigte, auf 30 °C temperierte Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8) in die Reaktionskammer gegeben und der Reaktionsansatz ohne verbleibenden Gasüberstand verschlossen. Anschließend wurden 75 μM NBT hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 1-10 μM einer gereinigten Proteinprobe gestartet, sobald sich eine stabile Basislinie ausgebildet hatte. Insbesondere die Sauerstofftoleranz der AH wurde auf diesem Weg bestimmt. Hierzu wurden H_2 - und O_2 -gesättigte Puffer (jeweils 50 mM Tris/HCl, pH 8) in Verhältnissen von 100:0 % bis 30:70 % gemischt (O_2 -Konzentrationen 0-780 μM). Aus der bei Zugabe der konstanten Menge von 227 μM H_2 -gesättigtem Puffer erreichten Änderung des Elektrodenpotentials konnte die H_2 -Verbrauchsrate einer Reaktion und damit die Aktivität des Enzyms bestimmt werden.

2.9 Spektroskopie

2.9.1 Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie

FTIR-Spektren wurden durch Dr. Olaf Rüdiger am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion (Mülheim/Ruhr) mit einem IFS 66v/s FTIR-Spektrometer (Bruker) mit einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Quecksilber-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor aufgenommen. Hierzu wurde eine Blendenöffnung von 1,5 mm verwendet; für ein Spektrum wurden 1000 Scans aufgezeichnet. Die Auflösung lag bei 2,0 cm^{-1} . Die Datenaufnahme erfolgte mit dem OPUS Softwarepaket (Bruker); für die Datenanalyse wurden eigenentwickelte, in MATLAB (Mathworks) geschriebene Routinen verwendet. Für die Untersuchungen wurden gereinigte Proteinproben mit Konzentrationen zwischen 200 und 500 μM eingesetzt. Zur Aufnahme von Spektren von durch H_2 reduzierten Proteinproben wurden die Probengefäße zunächst 30 min mit H_2 gespült und anschließend unter einem leichten H_2 -Überdruck für 1 h inkubiert.

FTIR-spektroskopische Messungen wurden auch bei elektrochemisch eingestellten Potentialen durchgeführt (IR-Spektroelektrochemie). Hierbei wurde eine dünne, optisch transparente elektrochemische Zelle mit zwei CaF_2 -Fenstern eingesetzt (Moss *et al.*, 1990), die direkt in ein FTIR-Spektrometer eingebaut ist. Gereinigte Proteinproben (200-500 μM) wurden bei 18 °C unterschiedlichen elektrochemisch eingestellten Potentialen unterworfen. Die Potentiale wurden mit Hilfe einer netzförmigen Goldelektrode (55 % Transmission) als Arbeitselektrode, einer Platin-Gegenelektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode durch einen Potentiostaten (VersaStat 4-400) eingestellt. Die Potentiale wurden schrittweise verändert; bei jedem Potential wurde nach 30 min Äquilibrationszeit ein FTIR-Spektrum aufgezeichnet.

2.9.2 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR)-Spektroskopie

EPR-spektroskopische Untersuchungen wurden durch Dr. Federico Roncaroli am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion in Mülheim/Ruhr durchgeführt. Spektren wurden in

der Regel an einem Bruker Elexsys E-580 Q-Band-Spektrometer (34,0213 GHz) mit zylindrischem Mikrowellenhohlraumresonator (Reijerse *et al.*, 2012) und einem Helium-Durchflusskryostaten (CF935, Oxford) durch Two-Pulse-Field-Swept Echo-Detected EPR-Spektroskopie bei 10 K aufgezeichnet. Hierzu wurde die Probe durch zwei Mikrowellenpulse von 12 ns und 24 ns im Abstand von 300 ns angeregt und das Spinecho detektiert. Gereinigte Proteinproben der AH wurden in EPR-Röhrchen mit einem Innendurchmesser von 2 mm im oxidierten und reduzierten Zustand gemessen. Die Reduktion der Probe wurde durch Inkubation mit 1 % H₂ in He und anschließend 100 % H₂ für 60 min bei 0 °C durchgeführt. Spinquantifizierungen wurden mit 1 mM Cu-EDTA als Referenzlösung durchgeführt.

2.10 Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung von Proteinen

Die Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung der AH wurde in Zusammenarbeit mit Sandra Hennig, Dr. Martin Bommer und Dr. Jae-Hun Jeoung aus der Arbeitsgruppe Prof. Holger Dobbek am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

2.10.1 Kristallisation der AH

Kristallisationsscreenings erfolgten aerob sowie unter anaeroben Bedingungen in einer Glovebox (95 % N₂, 5 % H₂; Model B, COY Laboratory Products) mit frischen oder eingefrorenen Präparationen der AH mit der *sitting-drop*-Methode. Als Kristallisationsbedingungen wurden zunächst unterschiedliche kommerzielle Screens (Hampton Research; Molecular Dimensions) verwendet. Die Ansätze wurden luftdicht versiegelt und bei 19 °C aufbewahrt. Die Kristallbildung fand im Zeitraum von 24 h bis mehreren Wochen statt. Ausgehend von dabei gefundenen Bedingungen wurden die Parameter in individuell entworfenen Screens in kleinen Schritten verändert. Für die Optimierung der Kristallbildung wurden auch unterschiedliche Proteinkonzentrationen (2,5-10 mg/ml, jeweils 1:1 mit dem Fällungspuffer gemischt) und Temperaturen (4 °C, 19 °C, Raumtemperatur) getestet. Für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff mit 1,2-Butandiol als Frostschutz eingefroren.

2.10.2 Röntgenstrukturbestimmung der AH

Datensätze für die Strukturbestimmung der AH wurden an der Beamline 14.1 des BESSY II-Synchrotrons (Berlin; Mueller *et al.*, 2012) durch Dr. Martin Bommer und Sandra Hennig aufgenommen. Hierbei wurden zahlreiche Kristalle aus unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen getestet. Von ausreichend gut streuenden Kristallen wurden vollständige Datensätze aufgenommen. Es wurde ein Datensatz bis 3,3 Å und zwei Datensätze bis 2,9 Å aufgezeichnet, einer davon bei 0,91841 Å = 13500 keV sowie einer bei 8,3328 keV = 1.4879 Å, was der Ni-Kante entspricht. Letzterer Datensatz wurde zur Strukturlösung verwendet. Diese Datensätze wurden mit der X-ray Detector Software (XDS; Kabsch, 2010) prozessiert und skaliert. Die Originaldaten wurden zur einfacheren Konstruktion des Modells mit Scala (CCP4-Packet; Collaborative Computational Project, 1994) auf 2,5 Å ausgedehnt. Die Struktur wurde durch Molecular Replacement mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2007) aus dem Phenix-Programmpaket (Adams *et al.*, 2010) und gelöst, wobei eine bekannte Struktur (PDB: 1CC1; Garcin *et al.*, 1999) als Modell verwendet wurde.

Die Verfeinerung der Struktur wurde iterativ mit den Programmen COOT (Emsley *et al.*, 2010), Phenix-Refine (Adams *et al.*, 2010) und CCP4-Refmac (Winn *et al.*, 2011) durchgeführt. Die Statistik der Verfeinerung ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Auswertung der Strukturdaten erfolgte mit dem Programm Pymol 1.6 (Schrödinger); Kontaktflächen zwischen Peptidketten wurden mit dem PISA-Server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/) berechnet.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder mit Hilfe der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) oder mit Hilfe eines Plasmid-Isolationskits (Invisorb Spin Plasmid Mini Two, Invitex) isoliert. Die alkalische Lyse wurde bei Plasmidisolierungen für analytische Zwecke verwendet, das Kit wurde für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA für präparative Zwecke und Sequenzierungen eingesetzt.

Für die alkalische Lyse wurden die Zellen aus 2 ml einer *E. coli*-Übernightkultur sedimentiert, das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNase) resuspendiert. Die Lysis der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1 % [w/v] SDS) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Durch anschließende Neutralisation mit 200 µl Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) wurden denaturierte Proteine und weitere Zellbestandteile gefällt, und durch Zentrifugation (15000 x g, 10 min, 4 °C; Heraeus Fresco 21, Thermo) gemeinsam mit der genomischen DNA sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 96 %-igem Ethanol und Inkubation für 20 min bei -20 °C gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (15000 x g, 20 min, 4 °C) sedimentiert, mit 500 µl 70 %-igem Ethanol [v/v] gewaschen und im Vakuum ca. 10 min getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

Bei der Verwendung des DNA-Isolationskits wurden die Zellen aus 2-10 ml einer *E. coli*-Übernightkultur eingesetzt und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch am NanoDrop-Spektrophotometer (ND-1000, Peqlab) durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1 bei einer optischen Weglänge d= 1 cm etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsängiger DNA/RNA. Die Verunreinigung der Lösungen durch Proteine wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} , welcher zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte, abgeschätzt. Insbesondere bei in Agarosegelen aufgetrennten Fragmenten aus Restriktionsansätzen wurde die DNA-Konzentration oft nach einer Fluoreszenzfärbung der Fragmente durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.11.3 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Hersteller New England Biolabs und Invitrogen eingesetzt. Die Reaktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit den bereitgestellten Puffern in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl durchgeführt. Für die Restriktion von 1 µg DNA wurde ein 2-10 Units entsprechendes Volumen Enzymlösung eingesetzt, jedoch maximal 10 % des Gesamtvolumens eines Ansatzes. Bei Restriktionen mit zwei Enzymen wurden nach Möglichkeit beide Enzyme dem Ansatz zugefügt, ansonsten wurden die Restriktionsreaktionen sequentiell durchgeführt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsreaktionen war hierfür eine zwischenzeitliche Reinigung der DNA nicht notwendig. Die Restriktionsansätze wurden üblicherweise 2-3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert, in einigen Fällen musste die Inkubationszeit auf bis zu 16 h ausgeweitet werden.

2.11.4 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religationen von geschnittenen Fragmenten im Restriktionsansatz zu vermeiden wurden deren endständige Phosphatgruppen dephosphoryliert. Hierzu wurde 1-5 U Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP), New England Biolabs) direkt in präparative Restriktionsansätze zugegeben und die Dephosphorylierung gemeinsam mit der Restriktionsreaktion durchgeführt.

2.11.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden *in-vitro* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (C1000 Thermal Cycler, Biorad) amplifiziert. Dabei konnten die amplifizierten DNA-Fragmente durch Einsatz geeigneter Primer an den Enden modifiziert werden, beispielsweise zur Einführung von Restriktionsschnittstellen.

Für präparative PCRs wurde die Phusion DNA-Polymerase (2 U/µl, New England Biolabs) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Reaktionsansätze enthielten 1 x eines geeigneten Reaktionspuffers (je nach Bedarf HF- oder GC-Puffer), 1 µl Phusion Polymerase (2 U), 0,5 µM jedes Primers (10 µM, Metabion), 200 µM dNTP-Mix, 3 % [v/v] DMSO und 20-100 ng Templat-DNA in ddH₂O. Das Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt (98 °C, 2 min), und im Regelfall 30 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt (98 °C, 20 s), einem Annealingschritt (je nach Schmelztemperatur der Primer 64-72 °C, 20 s), und einem Elongationsschritt (72 °C, 30 s pro 1000 bp Länge des gewünschten Amplifikats). Zum Abschluss wurde ein terminaler Elongationsschritt (72 °C, 6 min) durchgeführt. Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. War ausschließlich die gewünschte Bande vorhanden, wurde der Ansatz mit dem MSB Spin PCRapace-Kit (Invitex) nach Vorschrift aufgereinigt. Ansonsten wurde die gewünschte Bande aus einem präparativen Agarosegel isoliert.

Für analytische PCRs wurde die LongAmp Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Hierzu wurden in 20 µl-Ansätzen 1 x des LongAmp-Reaktionspuffers, 0,5 µl LongAmp-Polymerase (1,25 U), 0,5 µM jedes Primers (10 µM, Metabion) und 250 µM dNTP-Mix in ddH₂O eingesetzt. Als Templat wurde die Gesamt-DNA aus Einzelkolonien von Agarplatten verwendet. Hierfür wurden die Zellen von der Agarplatte abgenommen, in

Wasser resuspendiert und durch Kochen (5 min) aufgeschlossen. 1 µl dieses Lysats wurde in der PCR-Reaktion eingesetzt. Das Programm umfasste einen initialen Denaturierungsschritt (94 °C, 2 min), und 30 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt (94 °C, 30 s) und einem kombinierten Annealing- und Elongationsschritt (65 °C, 1 min pro 1000 bp Länge des gewünschten Amplifikats). Zum Abschluss wurde ein terminaler Elongationsschritt (65 °C, 10 min) durchgeführt. Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.11.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in geschnittene Vektoren wurden der geschnittene Vektor und das zu integrierende DNA-Fragment im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit einer Gesamtmenge von etwa 500-1000 ng DNA eingesetzt. Die Ligation wurde mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und dem darauf abgestimmten Puffer in 30 µl-Ansätzen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden für ca. 16 h bei 16 °C oder Raumtemperatur (ca. 22 °C) inkubiert.

2.11.7 InFusion Rekombination

Mit der InFusion Rekombination wurden DNA-Fragmente mit Hilfe einer speziellen Rekombinase zu zirkulären Plasmiden kombiniert. Hierfür waren homologe Bereiche von jeweils 15 Basenpaaren notwendig, die mittels PCR in die amplifizierten Fragmente integriert wurden. Für die Reaktion wurden in einem 10 µl-Ansatz 100 ng des linearisierten Vektors, 60 ng des zu insertierenden Fragments und 1 x In-Fusion HD Reaction Mix (2 µl) in ddH₂O eingesetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Im Anschluss wurden kompetente *E. coli* NEB 10β-Zellen mittels Hitzeschock mit dem Reaktionsansatz transformiert.

2.11.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Gelkammern gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden mit 1-1,5 % [w/v] hochschmelzender Agarose (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) in TPE-Puffer (80 mM Tris, 8 mM EDTA, pH 7,6 mit 85 % [w/v] Phosphorsäure eingestellt) angesetzt. Für präparative Agarosegele wurde zusätzlich 0,01 % GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte in TPE-Puffer bei einer Spannung von 90 V (ca. 45 min). Aufzutrennende DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit ca. 0,2 Volumenteilen Schwerelösung (33 % [v/v] Glycerin in TPE-Puffer; 0,07 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (200 µg in 200 ml ddH₂O) für ca. 10 min angefärbt und anschließend 10 min in ddH₂O entfärbt. Präparative Gele konnten auf Grund des bereits enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes direkt nach der Elektrophorese analysiert und weiter verarbeitet werden. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden in einem Gel-Imager-System (MultiImage II, Alpha Innotech) bei 254 nm sichtbar gemacht und mit dem Programm Alphaview (Alpha Innotech) fotografiert und dokumentiert. Als DNA-Größenstandard diente 2-log-Ladder (0,1-10 kbp, New England Biolabs).

2.11.9 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aus präparativen Gelen wurden die gewünschten DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator (UVT-14L, Herolab) bei 365 nm mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und

mit Hilfe des „QIAEX II Gel Extraction Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aus den ausgeschnittenen Gelstücken isoliert. Die Elution der Fragmente wurde bei 50 °C durchgeführt.

2.11.10 Sequenzierung

Die mittels PCR amplifizierten Abschnitte neu dargestellter Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf die korrekte Basensequenz überprüft. Hierzu wurden Oligonukleotide als Primer verwendet, die so gewählt wurden, dass mit ca. 600 Basen umfassenden Sequenzierreaktionen der gewählte DNA-Abschnitt vollständig überprüft werden konnte. Die Sequenzierreaktionen wurden an gereinigten Plasmiden von der Firma SMB (Services in Molecular Biology) Sequenzierservice durchgeführt.

2.12 Plasmidtransfer

2.12.1 Herstellung chemokompetenter Zellen für die Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock wurden chemokompetente Zellen des Wirtstammes hergestellt. Hierzu wurden die Stämme *E. coli* JM109, S17-1 oder DH5 α in 100 ml Kulturvolumen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und das Pellet in 30 ml kaltem TFB I-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer (10 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin, pH 8,0) aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.12.2 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation chemokompetenter Zellen der Stämme *E. coli* S17-1, DH5 α und JM109 wurden 50 μ L der Zellsuspension mit 1-10 μ L Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C (Thriller, Peqlab). Nach 1 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 200 μ l eines Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem je nach transferiertem Plasmid passenden Antibiotikum ausgestrichen. Zum Teil wurden auch die Zellen des gesamten Ansatzes sedimentiert, in geringerem Volumen resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation wurden elektrokompetente Zellen des Wirtstammes hergestellt. Hierzu wurden die Stämme *E. coli* JM109 oder DH5 α in 100 ml Kulturvolumen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden rasch auf 4 °C abgekühlt, geerntet und das Pellet in 25 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen in 400 μ l 10 % [v/v] Glycerin resuspendiert, zu je 50 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.12.4 Transformation durch Elektroporation

Für die Elektroporation von *E. coli* wurden elektrokompetente Zellen der Stämme *E. coli* JM109 oder DH5 α sowie salzfreie DNA eingesetzt. 50 μ l Zellsuspension wurde mit 1-10 μ l Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden in gekühlten 2 mm-Elektroporationsküvetten (Peqlab) in einem Elektroporator (Easyject Prima, Peqlab) mit einem 2500 V-Puls behandelt und sofort darauf mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, 200 μ l eines Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem je nach transferiertem Plasmid passenden Antibiotikum ausgestrichen. Zum Teil wurden auch die Zellen des gesamten Ansatzes sedimentiert, in geringerem Volumen resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12.5 Konjugation

E. coli S17-1 ist durch die im Chromosom vorhandenen *tra*-Gene des Plasmids RP4 zur Konjugation befähigt, und wurde eingesetzt, um mobilisierbare Plasmide auf Stämme von *R. eutropha* zu übertragen. Die zur Konjugation ausgewählten Stämme von *E. coli* bzw. *R. eutropha* wurden in 10 ml in LB- bzw. NB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Die Zellen wurden sedimentiert und die Pellets in 5 ml H16-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml H16-Puffer resuspendiert. Je 200 μ l der *E. coli*- und der *R. eutropha*-Zellsuspensionen wurden auf einer LB-Agarplatte vermischt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Zellmaterial wurde von der Agarplatte abgenommen und in 5 ml H16-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde jeweils in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10, 1:100 oder 1:1000) auf FN-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 2-3 Tage bei 37 °C kultiviert.

2.12.6 Doppelte homologe Rekombination

Wenn eine Modifikation auf dem Megaplasmid pHG1 von *R. eutropha* eingeführt werden sollte, wurde ein entsprechend konstruierter Suizidvektor mittels Konjugation wie in Kapitel 2.12.5 beschrieben in *R. eutropha* übertragen. Hieraus erhaltene Rekombinanten mit integriertem Suizidplasmid wurden auf FN-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum selektiert. Nach einem Reinigungsausstrich wurden Einzelkolonien auf LSLB-Sacc-Agarplatten ausgestrichen. Durch diese Bedingungen wurde das Wachstum von Zellen verhindert, die das auf dem Suizidplasmid codierte *sacB*-Gen ins Genom integriert hatten. Saccharose-resistente Einzelkolonien wurden nach einem Reinigungsausstrich auf FN-Agarplatten mit und ohne Antibiotikum ausgestrichen. Zellen, in denen die doppelte homologe Rekombination erfolgreich abgelaufen war, konnten ausschließlich auf antibiotikafreien FN-Agarplatten wachsen.

2.13 Gentechnische Konstruktionen

2.13.1 Austausch des nativen Promoters des AH-Operons gegen den Promoter des MBH-Operons

Die stromaufwärts und -abwärts des AH-Promoterbereiches gelegenen Sequenzen des Megaplasmid pHG1 wurden mit den Primern 3+4 bzw. 5+6 (Tabelle 2-3) amplifiziert und

nacheinander über die Schnittstellen für BglII und XbaI bzw. für NdeI und HindIII in das Plasmid pET24a (Novagen) insertiert. Der Promoter des MBH-Operons wurde vom Megaplasmid pHG1 mit den Primern 1+2 amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde mittels der XbaI- und NdeI-Schnittstellen in das resultierende Plasmid des vorhergehenden Schrittes insertiert. Hierdurch wurde das Plasmid pCH1676 erhalten, aus welchem der relevante Bereich mittels EcoRV und SmaI ausgeschnitten und in das mit PmeI linearisierte Plasmid pLO1 insertiert wurde. Durch eine doppelt homologe Rekombination mit dem resultierenden Suizidvektor pGE814 wurde in *R. eutropha* HF500 der native Promoter des AH-Operons gegen den Promoter des MBH-Operons ausgetauscht, wodurch der Stamm *R. eutropha* HF864 geschaffen wurde.

2.13.2 Deletion der großen Untereinheit der AH

Um die AH in verschiedenen Stammhintergründen von *R. eutropha* spezifisch zu deletieren wurde ein großes Fragment, welches das Gen *hofG* der großen Untereinheit der AH sowie flankierende Abschnitte enthielt, mit den Primern 8+9 vom Megaplasmid pHG1 amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde mittels XbaI-Schnittstellen in das gleichsam geschnittene Plasmid pLO1 insertiert. Aus dem resultierenden Plasmid pGE815 wurde mittels SexAI ein 1131bp-Fragment aus *hofG* entfernt. Durch doppelt homologe Rekombinationen mit dem hierbei entstandenen Suizidvektor pGE816 wurde die Deletion von *hofG* in *R. eutropha* HF864, HF500, HF803, HF371 und HF798 eingebracht, wodurch die Stämme *R. eutropha* HF865, HF866, HF867, HF868 und HF869 geschaffen wurden.

2.13.3 Deletion beider AH-Untereinheiten

Da für bestimmte Zwecke weder die große noch die kleine Untereinheit der AH produziert werden sollte, wurde ein Stamm konstruiert, in dem sowohl *hofK* als auch *hofG* deletiert sind. Zu diesem Zweck wurde ein Fragment, das das 5'-Ende von *hofK*, den MBH-Promoter und einen stromaufwärts von *hofK* gelegenen Sequenzbereich enthielt durch PCR mit den Primern 65+66 am Plasmid pCH1676 amplifiziert. Dieses Fragment wurde mittels der SacI- und BclI-Schnittstellen in das Plasmid pGE816 insertiert, wodurch das Plasmid pGE825 entstand. Durch doppelte homologe Rekombination in *R. eutropha* HF864 wurde der Stamm *R. eutropha* HF1036 geschaffen.

2.13.4 Konstruktion einer HofK_{Strep}-Variante der AH

Um die AH mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie reinigen zu können, wurde das Gen *hofK* der kleinen Untereinheit der AH mit der codierenden Sequenz für ein *Strep*-Affinitätspeptid modifiziert. Hierfür wurde zuerst ein Abschnitt von *hofK* mittels PCR mit den Primern 12+13 an pHG1 amplifiziert und dabei am 3'-Ende um die codierende Sequenz des *Strep*-Tags II erweitert. Das Fragment wurde mit NdeI und MluI geschnitten und in das gleichsam geschnittene Plasmid pLO1 insertiert. In das resultierende Plasmid wurde mittels der MluI- und XbaI-Schnittstellen ein zuvor durch Amplifikation von pHG1 mit den Primern 14+15 erzeugtes Fragment von *hofG* eingefügt, wodurch das Plasmid pGE817 entstand. Durch doppelte homologe Rekombination mit pGE817 wurde der Stamm *R. eutropha* HF901 geschaffen, der eine HofK_{Strep}-Variante der AH codiert.

2.13.5 Konstruktion einer unter der Kontrolle des SH-Promoters stehenden, auf einem Plasmid codierten *Strep*HofK-Variante der AH

Um ein plasmidbasiertes Expressionssystem der AH zu generieren, wurde ein Abschnitt des Plasmids pCH#2588 (O. Lenz, J. Hamann; nicht veröffentlicht) durch PCR mit den Primern 35+36 amplifiziert und über die Schnittstellen für AflIII und BglII in den gleichsam geschnittenen Vektor p2588 inseriert. Hierdurch wurde das Plasmid pGE818 mit den für die folgenden Schritte notwendigen Restriktionsschnittstellen erhalten. Durch PCR an pHG1 mit den Primern 37+38 wurde im zweiten Schritt das Gen *hofK* amplifiziert und am 5'-Ende um die den *Strep*-Tag II codierende DNA-Sequenz erweitert. Das PCR-Fragment wurde mit PciI und SacI geschnitten und in das mit NcoI und SacI geschnittene Plasmid pGE818 inseriert. In das resultierende Plasmid pGE819 wurde mittels der XbaI- und SacI-Schnittstellen ein durch PCR an pHG1 mit den Primern 40+44 amplifiziertes Fragment mit dem Gen *hofG* eingefügt, wodurch das Plasmid pGE822 entstand. Das Plasmid wurde konjugativ in *R. eutropha* HF865 und HF1036 übertragen, wodurch die Stämme *R. eutropha* HF1035 und HF1038 geschaffen wurden.

2.13.6 Konstruktion von Stämmen zur heterologen Produktion von Hydrogenasen aus *S. avermitilis* und *M. smegmatis* in *R. eutropha*

Um die zur AH verwandten Hydrogenasen aus *S. avermitilis* und *M. smegmatis* heterolog in *R. eutropha* zu produzieren wurden zu pGE822 analoge Expressionsplasmide konstruiert, in denen jeweils die Gene der beiden Hydrogenase-Untereinheiten unter der Kontrolle des SH-Promoters stehen. Die kleinen Untereinheiten sind jeweils durch einen N-terminalen *Strep*-Tag II modifiziert. Hierzu wurden von der Gesamt-DNA beider Quellorganismen die Gene der beiden Untereinheiten jeweils gemeinsam amplifiziert. Für *S. avermitilis* wurden dabei die Primer 72+73, für *M. smegmatis* die Primer 74+75 verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden jeweils mit Hilfe der InFusion-Rekombination in das mit NheI und SacI geschnittene Plasmid pGE822 inseriert, wodurch die Plasmide pGE827 (*S. avermitilis*) und pGE828 (*M. smegmatis*) entstanden. Durch konjugativen Transfer dieser Plasmide in *R. eutropha* wurden die Stämme *R. eutropha* HF1040 (*S. avermitilis*) und HF1041 (*M. smegmatis*) geschaffen.

2.13.7 Darstellung von Mutationen des Aspartats am proximalen [FeS]-Cluster der AH

Um Mutationen des Aspartats am proximalen [FeS]-Cluster zu erzeugen, wurden die gewünschten Mutationen mit Hilfe einer Drei-Primer-PCR am Plasmid pGE822 eingeführt. Hierbei wurden im ersten Schritt mit den Primern 37 und 84-89 jeweils 150 bp-Fragmente mit den Mutationen erzeugt, welche zusammen mit Primer 38 als Primer der zweiten Teilreaktion verwendet wurden. Die daraus resultierenden Fragmente wurden über die NheI- und XbaI-Schnittstellen in das gleichsam geschnittene Plasmid pGE822 inseriert, wodurch die Plasmide pGE831 bis pGE836 erzeugt wurden. Diese Plasmide wurden konjugativ in *R. eutropha* HF1036 übertragen, woraus die Stämme *R. eutropha* HF1048 bis HF1053 resultierten.

2.14 Dokumentation und Datenverarbeitung

Klonierungen wurden mit dem Programm SE Central (Sci-Ed Software) geplant. Die Sequenzchromatogramme wurden mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Software) und dem Online-Tool BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ausgewertet. Die Dokumentation gefärbter Polyacrylamidgele erfolgte durch Scannen mit 300-600 dpi. Grafiken und Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS5 und CorelDraw X5 bearbeitet. Allgemeine und manuelle Datenauswertungen und die Erzeugung von Graphen erfolgte mit Microsoft Excel 2007 und SigmaPlot 12.3. Aktivitätsmessungen und UV/Vis-Spektren wurden mit dem Programm CaryWin 3.0 ausgewertet. Die Auswertung der RT-qPCR-Daten erfolgte mit der Software 7500 FastSDS. Gaschromatogramme wurden mit dem Programm CG Solution (Shimadzu) aufgezeichnet und analysiert. Die Steuerung und Analyse von amperometrischen Messungen erfolgte mit dem Programm Oxygraph Plus (Hansatech). Mit dem Programm Pymol 1.6 (Schrödinger) wurden PDB-Dateien analysiert und Abbildungen erzeugt. Datenbankabgleiche wurden mit dem Programm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt; multiple Aminosäuresequenzvergleiche erfolgten mit Hilfe des Programms ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Die vergleichende Analyse annotierter Genome erfolgte mit dem Programm SEED viewer (<http://seed-viewer.theseed.org/>). Zur Vorhersage von potentiellen transmembranen Helices und Signalpeptiden wurden verschiedene auf dem Server Expasy (<http://www.expasy.org/proteomics>) verfügbare, geeignete Programme eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 In *Ralstonia eutropha* wird funktionale „Actinobakterielle Hydrogenase“ (AH) gebildet, deren Aktivität sich *in-vivo* und in Zellextrakten nachweisen lässt

Als initiale Fragestellung der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die Actinobakterielle Hydrogenase (AH) in *Ralstonia eutropha* gebildet wird und ob dabei funktionelles Enzym entsteht. Um die Gene der AH unter Standardbedingungen zu exprimieren wurde der als inaktiv angenommene native Promoter des AH-Operons durch den Promoter der membrangebundenen Hydrogenase (MBH) aus *R. eutropha* ersetzt, der bekanntermaßen unter definierten Anzuchtbedingungen aktiv ist.

Als Basis für diese genetischen Arbeiten wurde der Stamm *R. eutropha* HF500 verwendet, in dem jeweils die großen Untereinheiten der anderen drei Hydrogenasen durch isogene Deletionen entfernt worden waren (Genotyp: $\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$, $\Delta hoxC$; Phänotyp MBH⁻, SH⁻, RH⁻; Kleihues *et al.*, 2000). Die AH-Gene stehen in diesem Stamm unter Kontrolle des nativen Promoters, daher wird dieser Stamm im Folgenden mit P_{AH}-AH beschrieben. Der native Promoter wurde im Stamm HF500 mittels homologer Rekombination gegen den MBH-Promoter ausgetauscht, woraus der Stamm HF864 (P_{MBH}-AH) resultierte.

Um mögliche Aktivität der AH von Hintergrundreaktionen unterscheiden zu können wurde ausgehend von dem Stamm HF500 durch isogene Deletion des Gens der großen Untereinheit der AH, *hofG* (für *hydrogen oxidizing enzyme four*), der Stamm HF866 ($\Delta hofG$; AH⁻) konstruiert. Analog dazu wurde aus dem Stamm HF864 (P_{MBH}-AH) der Stamm HF865 (P_{MBH}-AH⁻) konstruiert.

3.1.1 Mittels Gaschromatographie kann die AH-vermittelte H₂-Aufnahme lebender Zellen nachgewiesen werden

Um die Aktivität der AH zunächst ohne Kenntnis der zellulären Lokalisation oder eines Elektronenakzeptors nachzuweisen, wurde der Wasserstoffverbrauch lebender Zellen in einer Flüssigkultur mittels Gaschromatographie verfolgt. Hierzu wurden die Stämme HF500 (P_{AH}-AH) und HF864 (P_{MBH}-AH) verwendet, in denen jeweils keine anderen Hydrogenasen außer der AH gebildet werden können. Zur Kontrolle wurde der Hydrogenase-freie Stamm HF866 (AH⁻) verwendet. In FGN-Medium bis in die spätexponentielle Phase (OD₄₃₆ ca. 10) gewachsene Kulturen dieser Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 0,3 % H₂ in Luft gesetzt. Nachfolgend wurde der Wasserstoffgehalt der Atmosphäre in 30-60 min-Intervallen bestimmt.

In der Tat konnte eine deutliche Abnahme der H₂-Konzentration für den Stamm HF864 beobachtet werden, während im Falle der Negativkontrolle, *R. eutropha* HF866, die Wasserstoffkonzentration während der Messung konstant blieb. Überraschenderweise zeigte auch der Stamm HF500, in dem die AH unter Kontrolle ihres nativen Promoters steht,

deutlich messbaren H_2 -Verbrauch. Dieses Ergebnis zeigt, dass die AH nicht nur funktionell gebildet werden kann, sondern selbst unter Standardbedingungen gebildet wird. Um die *in-vivo* H_2 -Oxidationsaktivitäten ohne Kenntnis der Proteinmenge in den Zellen vergleichen zu können, wurden die gemessenen Aktivitäten auf diejenige Zellmenge normiert, die bei einer OD_{436} von 10 in 100 ml Kultur vorhanden ist. Die Berechnung der *in-vivo* H_2 -Oxidationsaktivitäten aus den H_2 -Verbrauchskurven ergab für den Stamm HF500 einen Wert von $0,074 \pm 0,007$ U/(1000 OD·ml), sowie eine Aktivität von $0,438 \pm 0,016$ U/(1000 OD·ml) für den Stamm HF864. Damit liegt die Wasserstoffaufnahme-aktivität in letzterem Stamm um etwa den Faktor 5,9 höher (Abbildung 3-1).

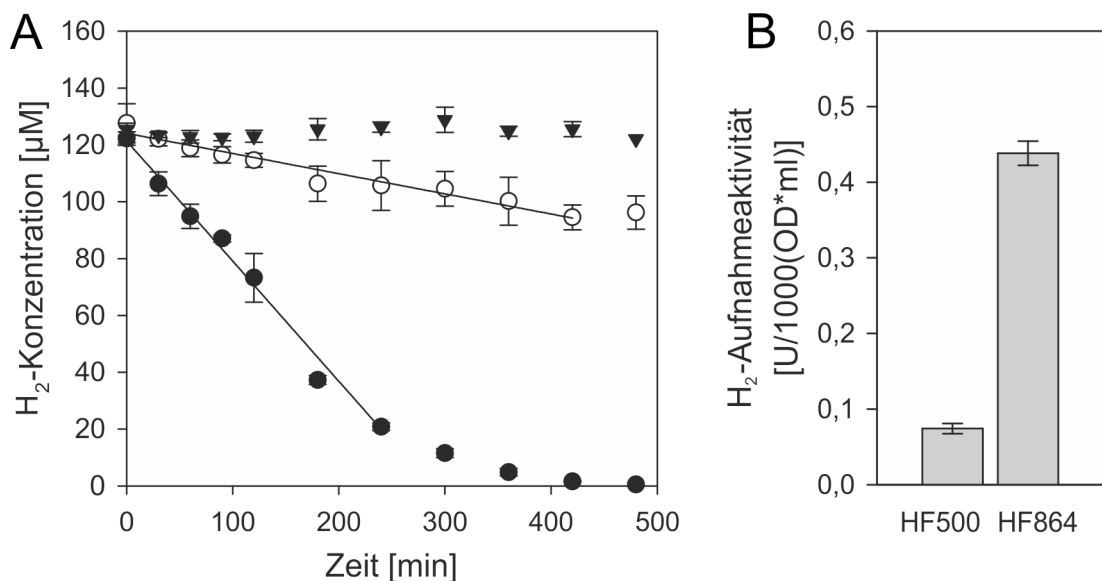


Abbildung 3-1: A) *In-vivo* Wasserstoffverbrauch der Stämme HF500 (P_{AH^-} -AH; offene Kreise), HF864 (P_{MBH^-} -AH; gefüllte Kreise) und HF866 (AH^- ; gefüllte Dreiecke) und Regressionsgeraden für die Ermittlung der *in-vivo*-Aktivitäten. Bis ca. zu einer OD_{436} von 10 gewachsene Flüssigkulturen der genannten Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 0,3 % H_2 in Luft gesetzt. Der Wasserstoffgehalt der Gasphase wurde in regelmäßigen Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt. B) Ermittelte *in-vivo*-Aktivitäten aus A).

3.1.2 Die AH kann in nativen Gelen aufgetrennt und durch Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht werden

Außer durch die zuvor beschriebenen Messungen konnte die H_2 -Aufnahmeaktivität auch durch Aktivitätsfärbung von durch CN-PAGE aufgetrennten löslichen Zellextrakten nachgewiesen werden. Hierfür wurde allerdings ein Elektronenakzeptor benötigt, der zunächst experimentell ermittelt werden musste. In Analogie zu equivalenten Experimenten mit MBH und RH ließ sich die H_2 -Aufnahmeaktivität der AH mit einem gekoppelten System bestehend aus Phenazinmethosulfat (PMS) als Elektronenakzeptor und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) als Färbungsreagenz im Gel sichtbar machen. In Folge der systematischen Ermittlung eines geeigneten Elektronenakzeptors für photometrische Assays (siehe Kapitel 3.6.1.1) wurde jedoch später festgestellt, dass NBT ein direkter Elektronenakzeptor der AH ist und PMS in der Aktivitätsfärbung nativer Gele demzufolge

nicht benötigt wird (Abbildung 3-2). Bei der Aktivitätsfärbung in Gelen wurden somit mit oder ohne PMS die gleichen Ergebnisse erzielt. Die Aktivitätsfärbung der nativen Gele wurde in H_2 - oder zur Kontrolle in N_2 -gesättigtem Puffer durchgeführt. In Anwesenheit von Wasserstoff zeigte sich die Aktivität der AH in den Extrakten der Stämme HF500 ($P_{AH^-}AH$) und HF864 ($P_{MBH^-}AH$) in Form zweier eng beieinander liegender Banden. Der Stamm HF866 (AH^-) zeigte an diesen Positionen keinerlei Färbung in den entwickelten Gelen (Abbildung 3-2). In allen Proben trat eine weitere Bande unterhalb der AH-Doppelbande auf, die auch in Abwesenheit von H_2 sichtbar war. Diese Bande ist also nicht auf Hydrogenaseaktivität zurückzuführen. Sie konnte jedoch als interne Kontrolle für die Laufhöhe der Hydrogenasebanden und die aufgetragene Proteinmenge verwendet werden. Der in den *in-vivo*-Messungen (siehe Kapitel 3.1.1) festgestellte deutliche Unterschied zwischen den H_2 -Aufnahmeaktivitäten der Stämme HF864 und HF500 wurde auch in der Aktivitätsfärbung in Form von stark unterschiedlicher Bandenintensität resultierend aus den Extrakten der beiden Stämme beobachtet. Eine sehr starke Doppelbande entwickelte sich für den Extrakt des Stammes HF864, deutlich schwächer, aber ebenfalls gut sichtbar zeigte sich die Doppelbande im Extrakt des Stammes HF500. Die Ursache für die Ausprägung von zwei Banden wurde ebenfalls untersucht und ist in Kapitel 3.4 beschrieben.

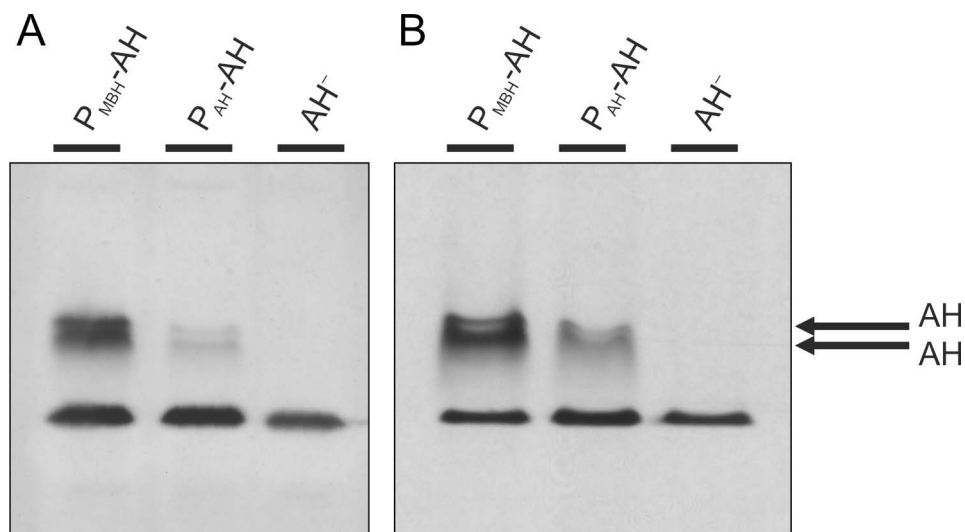


Abbildung 3-2: Banden der H_2 -Oxidationsaktivität der AH in nativen Gelen. Lösliche Extrakte der Stämme HF864 ($P_{MBH^-}AH$), HF500 ($P_{AH^-}AH$) und HF866 (AH^-) wurden durch CN-PAGE aufgetrennt. Die Hydrogenasebanden wurden im Anschluss anhand ihrer H_2 -abhängigen NBT-Reduktionsaktivität sichtbar gemacht. A) Färbereaktion mit PMS und NBT. B) Färbereaktion mit NBT.

3.2 Untersuchungen zur physiologischen Rolle der AH in *R. eutropha*

3.2.1 Die Genexpression der AH ist unter Standardbedingungen nachweisbar, liegt aber auf niedrigem Niveau

Die AH konnte nicht nur anhand der H_2 -Oxidationsaktivitäten nachgewiesen werden; auch die Menge der gebildeten Transkripte wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Diese Methode erlaubte

neben einem Nachweis der Transkripte der AH-Untereinheiten eine Bestimmung der Transkriptmengen der Stämme HF500 (P_{AH} -AH) und HF864 (P_{MBH} -AH) sowie einen Vergleich der Expression der AH zu der Expression der anderen Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*. Es wurden relative und absolute Quantifizierungen der Expression des Gens der kleinen Untereinheit der AH, *hofK*, vorgenommen. Hierfür wurden Zellen aus Flüssigkulturen in Fructose-Glycerin-Medium (FGN) verwendet, die bis zu einer optischen Dichte (OD_{436}) von 8 gewachsen waren. Unter diesen Bedingungen befinden sich die Zellen in einer spätexponentiellen Wachstumsphase mit Glycerin als C-Quelle. Es mussten Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet werden, da für die Methode der relativen Quantifizierung von Transkripten ein konstitutiv exprimiertes endogenes Kontrollgen benötigt wird. Das hierfür am besten geeignete Gen, *gyrB*, welches eine Untereinheit der Gyrase codiert, wird unabhängig von einer bestimmten C-Quelle jedoch nur bei exponentiellem Wachstum konstitutiv exprimiert (Lütte, 2007).

Die Transkripte von *hofK* waren in allen Proben der Stämme HF500 und HF864 deutlich nachweisbar. Der Vergleich der Transkriptmengen in beiden Stämmen durch relative Quantifizierung ergab eine ca. 3-fach höhere Transkriptmenge unter der Kontrolle des MBH-Promoters im Vergleich zu dem nativen Promoter (Abbildung 3-3A).

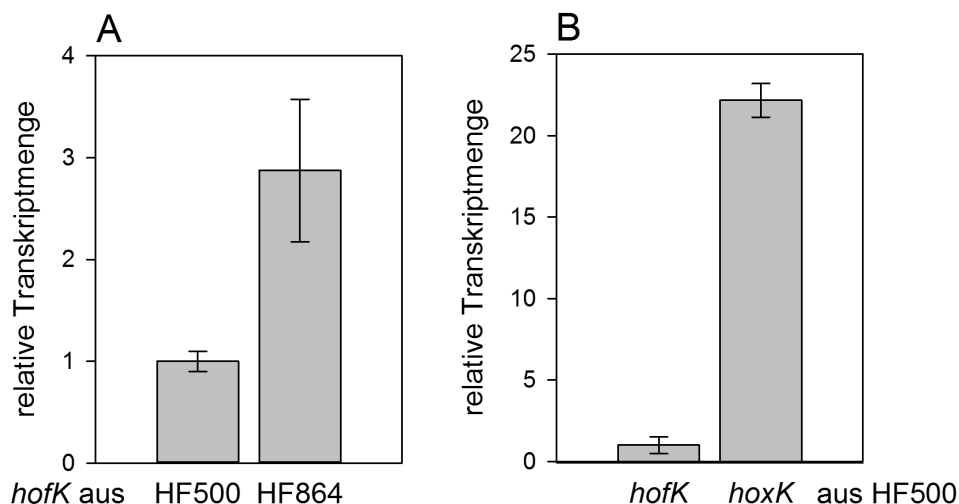


Abbildung 3-3: A) Quantifizierung der Transkripte von *hofK* in den Stämmen HF500 (P_{AH} -AH) und HF864 (P_{MBH} -AH). Die Transkripte wurden aus bis zu einer OD_{436} von 8 gewachsenen Zellen isoliert und mittels RT-qPCR mit der endogenen Kontrolle *gyrB* relativ quantifiziert. B) Vergleich der Expression von *hofK* und *hoxK* im Stamm HF500. Die Transkripte wurden aus bis zu einer OD_{436} von 8 gewachsenen Zellen isoliert und mittels RT-qPCR absolut quantifiziert. Die Werte wurden jeweils relativ zur Transkriptmenge von *hofK* im Stamm HF500 dargestellt.

Des Weiteren wurde die Transkriptmenge von *hofK* mit den Transkripten des Gens der kleinen Untereinheit der MBH, *hoxK*, verglichen. Hierzu wurde eine absolute Quantifizierung durchgeführt, da die relative Quantifizierung zwar den Vergleich der Transkriptmenge eines Gens in verschiedenen Stämmen erlaubt, der Vergleich der Transkriptmenge zweier unterschiedlicher Gene in demselben Stamm jedoch nicht möglich ist. Um die daraus gewonnenen Resultate besser mit den Ergebnissen der zuvor dargestellten Untersuchungen

vergleichen zu können, wurde die Untersuchung ebenfalls am Stamm HF500 durchgeführt. Dieser Stamm zeigt auf der Aktivitätsebene einen Phänotyp frei von MBH-, SH- und RH-Aktivitäten, da in den Operons der MBH, SH und RH jeweils eines der Strukturgene isogenisch deletiert worden war (Genotyp: $\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$, $\Delta hoxC$). Für die stromaufwärts der Deletionen gelegenen Gene konnte dennoch von einer weitgehend unbeeinflussten Transkription ausgegangen werden. Es ergab sich unter den gewählten Bedingungen ein etwa 20-fach geringeres Expressionsniveau der AH-Genen gegenüber den MBH-Genen (Abbildung 3-3B).

3.2.2 AH-Genexpression unter verschiedenen Bedingungen

3.2.2.1 AH-Genexpression in Gegenwart verschiedener C-Quellen

Um Informationen über die Bedingungen zu gewinnen, unter denen die AH gebildet wird, wurden mittels RT-PCR die Transkriptmengen von *hofK* und des AH-Maturationsgens *hypC2* in unterschiedlich kultivierten Proben des Wildtypstammes *R. eutropha* H16 bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in Nährmedien mit unterschiedlichen C-Quellen angezogen. Da die Kultivierung der Zellen nicht mit allen C-Quellen bis zu hohen optischen Dichten möglich war, wurden Kulturen mit einer OD_{436} von 1 verwendet. Hierdurch war in allen untersuchten Bedingungen die Probenentnahme in der Phase des exponentiellen Wachstums gewährleistet. Für das Strukturgen *hofK* und das Maturationsgen *hypC2* zeigten sich geringe Transkriptmengen bei Wachstum auf Fructose oder H_2/CO_2 (autotrophes Wachstum mit CO_2 als C-Quelle und H_2 als Energiequelle). Für das Wachstum auf Glycerin bzw. Succinat ergaben sich für *hofK* gegenüber dem Wachstum auf Fructose stark erhöhte Transkriptniveaus. Dabei wurde für *hofK* die stärkste Expression mit Glycerin gefunden, für *hypC2* hingegen mit Succinat als C-Quelle (Abbildung 3-4). Diejenige C-Quelle, die unter den vorliegenden Bedingungen zu der höchsten Expression der AH führt, ist Glycerin, welches im Nährmedium für *R. eutropha* standardmäßig eingesetzt wird, um die Expression von Hydrogenasen zu gewährleisten.

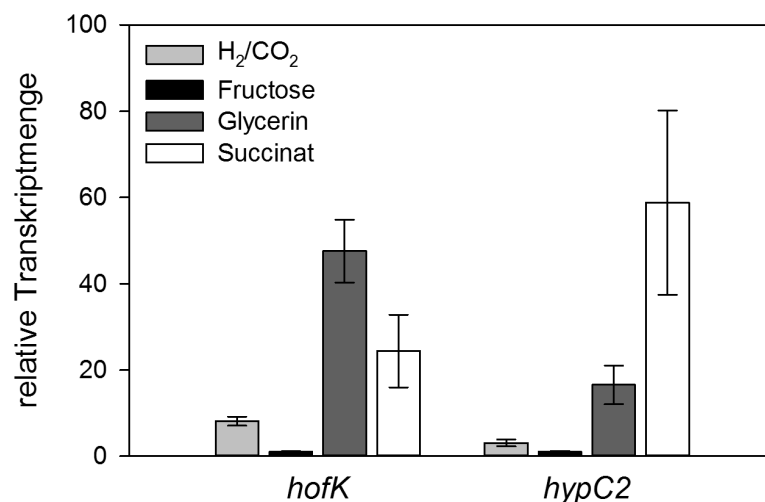


Abbildung 3-4: Relative Transkriptmengen der Gene *hofK* und *hypC2* in *R. eutropha* H16 bei Wachstum mit unterschiedlichen C-Quellen. C-Quellen von links nach rechts: H_2/CO_2 (hellgrau), Fructose (schwarz), Glycerin (dunkelgrau), Succinat (weiß). Die Transkripte wurden aus bis zu einer OD_{436} von 1 gewachsenen Zellen isoliert und mittels RT-qPCR mit der endogenen Kontrolle *gyrB* relativ quantifiziert. Die relativen Transkriptmengen beider Gene wurden jeweils auf das Wachstum mit Fructose bezogen.

3.2.2.2 AH-Genexpression unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Für die MBH und die SH wurde gezeigt, dass bei Kultivierung von *R. eutropha* unter Limitation von Sauerstoff höhere Proteinausbeuten und höhere Aktivitäten erzielt werden (Goris *et al.*, 2011; Fritsch, 2011). Um diesbezügliche Daten auch für die AH zu gewinnen und die Aussagen für die MBH und die SH auf Transkriptebene zu belegen wurde mittels RT-qPCR eine Serie von Zellproben untersucht, die unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert worden waren. Die Sauerstoffkonzentrationen wurden dabei nicht exakt eingestellt bzw. ermittelt, sondern ergaben sich aus unterschiedlichen Volumenanteilen, zu denen die zur Kultivierung verwendeten 5 l-Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen mit Nährmedium gefüllt wurden. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Befüllung der Kolben mit 4 l Medium (80 % des Nominalvolumens) anstatt mit 1 l (20 % des Nominalvolumens) ein deutlich verlangsamtes Zellwachstum von *R. eutropha* zur Folge hatte. Diese Beobachtung wurde mit einer geringeren Sauerstoffkonzentration erklärt, die auf Grund einer verkleinerten Grenzfläche zur Atmosphäre bei gleichzeitigem höherem Füllstand im Kolben eintritt (Fritsch, 2011).

Die Untersuchungen wurden an bis zu einer OD₄₃₆ von 8 kultivierten Proben durchgeführt. Da in gleichartigen Proben auch die Aktivität der AH überprüft werden sollte, wurde der Stamm HF500 ($\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$, $\Delta hoxC$; MBH⁻, SH⁻, RH⁻) verwendet. Die stromaufwärts der jeweiligen Deletion in den Hydrogenase-Operons liegenden Gene werden jedoch unverändert abgelesen (siehe auch Kapitel 3.2.1). Daher konnten die Transkriptmengen der Gene für die kleine Untereinheit der MBH, *hoxK*, und für die große Untereinheit des Diaphorasemoduls der SH, *hoxF*, bestimmt werden.

Für die zwei untersuchten Gene aus dem AH-Operon, *hofK* und *hypC2*, wurden die größten Transkriptmengen jeweils bei 40 % der maximalen Kolbenfüllung gefunden; die Expression dieser Gene bei 80 % Füllhöhe entsprach ungefähr derjenigen bei 20 % Füllung (Abbildung 3-5A). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Limitation des Zellwachstums durch Sauerstoffmangel und eine damit einhergehende verlängerte Wachstumsdauer erst ab ca. 70 % Kolbenfüllung eintreten. Die Aktivität und Genexpression der MBH erhöhte sich unter diesen Bedingungen signifikant (Fritsch, 2011). Für die AH wurde eine Erhöhung der Genexpression unter Sauerstofflimitation damit nicht festgestellt. Eine leichte Verringerung der Sauerstoffzufuhr, die nicht zu Sauerstofflimitation führt, dürfte zu dem bei 40 % Füllhöhe beobachteten positiven Effekt auf die Genexpression der AH führen. Im Gegensatz dazu wurde für die untersuchten Gene des MBH- und SH-Operons, *hoxK* und *hoxF*, eine Zunahme der Transkriptmengen mit sinkenden Sauerstoffkonzentrationen bestimmt. Bei 80 % Füllung betrug die Transkriptmenge im Falle von *hoxK* etwa das 8-fache des Wertes bei 20 % Füllhöhe; für *hoxF* wurde sogar eine 73-fache Erhöhung der Expression gefunden (Abbildung 3-5B). Die aus vorherigen Studien für die MBH und die SH bekannte Abhängigkeit der Aktivität und der gebildeten Proteinmenge von der Sauerstoffkonzentration (Goris *et al.*, 2011; Lauterbach, 2013) konnte somit auch auf der Ebene der Transkripte nachgewiesen und quantifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für eine Überproduktion der AH Stämme von *R. eutropha* kultiviert, in denen die Strukturgene oder das gesamte Operon der AH unter der Kontrolle entweder des Promoters der MBH oder desjenigen der löslichen Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* standen. Diese Zellkultivierungen wurden in zu 80 % mit Nährmedium gefüllten Schüttelkolben durchgeführt.

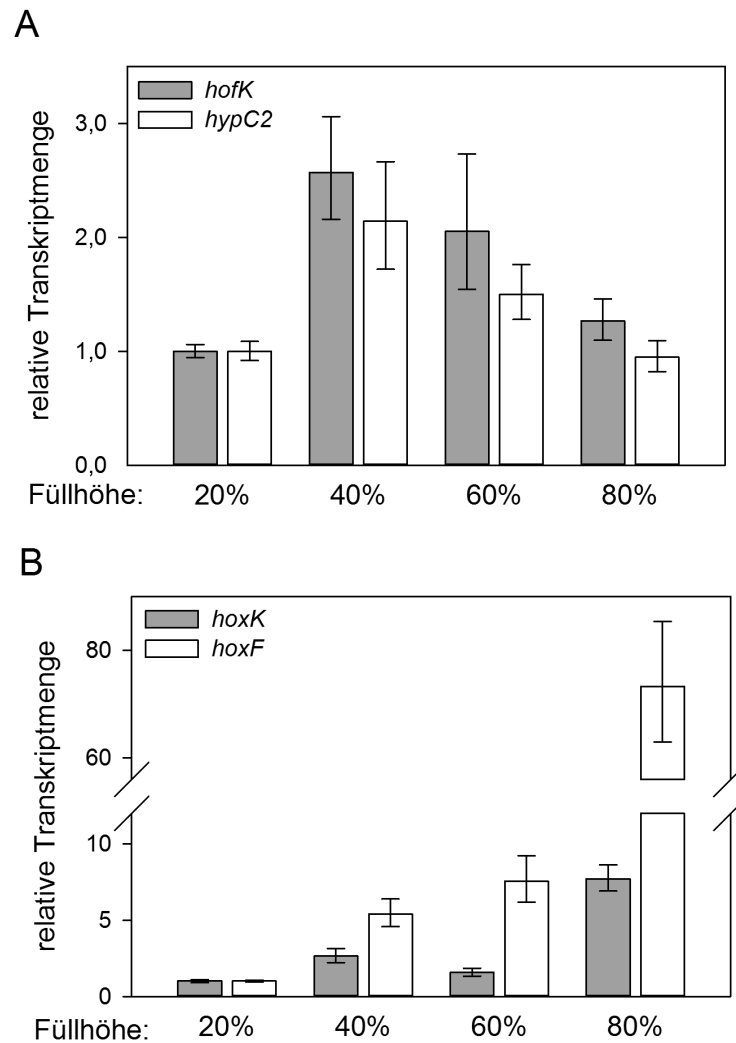


Abbildung 3-5: Relative Transkriptmengen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Der Stamm *R. eutropha* HF500 (P_{AH}-AH) wurde in verschiedenen hoch mit Nährmedium befüllten Schüttelkolben angezogen, um unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in der Kultur zu erzielen. Die Transkripte wurden aus bis zu einer OD₄₃₆ von 8 gewachsenen Zellen isoliert und mittels RT-qPCR mit der endogenen Kontrolle *gyrB* relativ quantifiziert. A) Transkriptmengen von *hofK* (grau) und *hypC2* (weiß). B) Transkriptmengen von *hoxK* (grau) und *hoxF* (weiß). Die relativen Transkriptmengen jedes Gens wurden jeweils auf die Werte bei 20 % Füllung bezogen.

3.2.2.3 Genexpression der AH unter verschiedenen regulatorischen Regimes

Um Informationen über die Regulation der AH und über die Bedingungen zu gewinnen, unter denen die AH aktiv ist, wurde mittels RT-qPCR die Transkriptmenge von *hofK* in verschiedenen Stämmen von *R. eutropha* bestimmt, in denen jeweils ein Regulationssystem durch Deletion eines der beteiligten Gene inaktiviert worden war. Hierzu wurden die Stämme HF09, HF409, und HF883 mit dem Stamm HF500 (P_{AH}-AH) verglichen. Der Stamm HF09 enthielt eine Deletion des Gens *rpoN* des Faktors Sigma-54 der RNA-Polymerase, welcher bei Stickstoffmangel aktiviert wird ($\Delta rpoN$; Schink & Schlegel, 1978; Römermann *et al.*, 1989). Im Stamm HF409 fehlte durch Deletion des entsprechenden Gens der Transkriptionsfaktor HoxA, der unter Anderem in Verbindung mit der Regulatorischen Hydrogenase (RH) die wasserstoffabhängige Expression der MBH und der SH reguliert ($\Delta hoxA$; Lenz *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde der Stamm HF883 eingesetzt, in dem das Gen des bislang einzigen in

R. eutropha als funktional identifizierten Fumarat-Nitrat-Reduktaseregulators deletiert worden war ($\Delta fnr3$; Lütte, 2009). Dieser Regulator wird im Organismus für die Kontrolle der Genexpression bei geringen Sauerstoffkonzentrationen eingesetzt. Die Untersuchungen wurden an in FGN-Medium bis zu einer OD_{436} von 8 kultivierten Proben durchgeführt.

Für *hofK* wurden für die drei untersuchten Stämme HF09 ($RpoN^-$), HF409 ($HoxA^-$) und HF883 ($FNR3^-$) gegenüber dem Vergleichsstamm HF500 ($P_{AH^-}AH$) leicht verringerte Transkriptmengen gefunden. Für *hypC2* ergaben sich leicht erhöhte Transkriptmengen. In allen Fällen ist der Unterschied zum Vergleichsstamm jedoch geringer als Faktor 2. Damit sind die Unterschiede zu gering, als dass unter den vorliegenden Bedingungen von einem signifikanten Einfluss der untersuchten Regulatoren auf die Expression der AH ausgegangen werden kann.

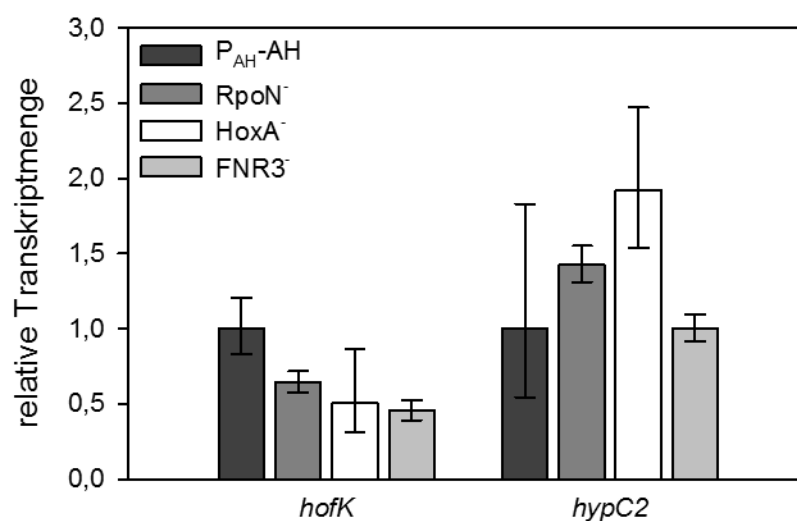


Abbildung 3-6: Relative Transkriptmengen der Gene *hofK* und *hypC2* in verschiedenen Mutanten von *R. eutropha*. Mutanten von links nach rechts: HF500 ($P_{AH^-}AH$), HF09 ($RpoN^-$), HF409 ($HoxA^-$) HF883 ($FNR3^-$). Die Transkripte wurden aus bis zu einer OD_{436} von 8 gewachsenen Zellen isoliert und mittels RT-qPCR mit der endogenen Kontrolle *gyrB* relativ quantifiziert. Die relativen Transkriptmengen beider Gene wurden jeweils auf die Menge im Stamm HF500 ($P_{AH^-}AH$) bezogen.

3.2.3 Aktivität der AH unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Neben den Untersuchungen der Genexpression der AH mittels RT-qPCR wurden auch Experimente durchgeführt, die auf der Ebene der Enzymaktivität Hinweise darauf liefern sollten, wie die AH in *R. eutropha* reguliert wird. Für diese Untersuchungen wurden aus unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultivierten Zellen die löslichen Extrakte gewonnen und durch CN-PAGE aufgetrennt. Die Hydrogenaseaktivitäten wurden wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben mit PMS und NBT sichtbar gemacht. Hierbei wurden wiederum die Stämme HF500 und HF864 untersucht.

3.2.3.1 Aktivität der AH in Fructose-Glycerin-Medium und dessen Komponenten in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase

Nachdem in Zellen der Stämme HF500 ($P_{AH^-}AH$) und HF864 ($P_{MBH^-}AH$) nach Kultivierung in Fructose-Glycerin-Medium (FGN) die Aktivität der AH nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.2), wurde die Aktivität der AH in diesem System nochmals eingehender

untersucht. Hierzu wurde die Aktivität der AH in FGN-Medium in der exponentiellen (Wachstum bis zu einer OD_{436} von ungefähr 8) und der stationären Wachstumsphase ($OD_{436} > 11$) sowie bei Wachstum mit Fructose oder Glycerin als jeweils einziger C-Quelle getestet.

Bei den in FGN-Medium kultivierten Proben wurde die Aktivität der AH in der stationären Phase (siehe auch Kapitel 3.1.2) als schwache Doppelbande im Stamm HF500 und als starke Doppelbande im Stamm HF864 nachgewiesen (Abbildung 3-7A). In denjenigen Proben, die der exponentiellen Wachstumsphase entstammten, konnten für beide Stämme keine Aktivitätsbanden beobachtet werden. Schwache Banden traten bei Proben des Stammes HF500 ebenfalls in der stationären Wachstumsphase auf, wenn diese anstatt in FGN-Medium mit Fructose oder Glycerin als einziger C-Quelle kultiviert worden waren (Abbildung 3-7B). Somit erscheint eine Regulation wahrscheinlich, bei der die Gene des AH-Operons in der exponentiellen Wachstumsphase nur schwach exprimiert werden, und die Expression erst beim Eintritt in die stationäre Phase so stark aktiviert wird, dass die Aktivität der AH eindeutig nachgewiesen werden kann.

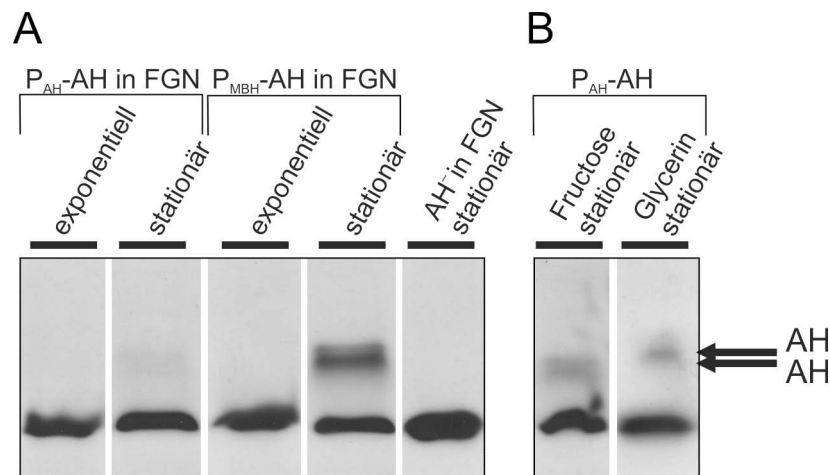


Abbildung 3-7: A) Banden der H_2 -Oxidationsaktivität der AH in nativen Gelen nach Kultivierung der Stämme HF500 (P_{AH}-AH) und HF864 (P_{MBH}-AH) in Fructose-Glycerin-Medium (FGN). Proben der AH wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{436} ca. 8) und der stationären Wachstumsphase (OD_{436} ca. 12) entnommen. Die löslichen Extrakte wurden mittels CN-PAGE aufgetrennt, die Hydrogenasebanden wurden im Anschluss anhand ihrer H_2 -abhängigen NBT-Reduktionsaktivität sichtbar gemacht. B) Aktivität der AH bei Kultivierung mit Fructose oder Glycerin als C-Quelle

3.2.3.2 Aktivität der AH bei Kultivierung mit anderen C-Quellen

Neben Fructose und Glycerin wurden weitere Substrate darauf getestet, ob bei Kultivierung von *R. eutropha* auf dem jeweiligen Substrat aktive AH gebildet wird. Hierfür wurde ein breites Spektrum von Substanzen getestet, die von *R. eutropha* als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden können. Die Liste umfasste Histidin, Pyruvat, Glutamat, Gluconat, Acetat, Succinat und Formiat. Die vier erstgenannten Substrate wurden jeweils in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase getestet, Acetat, Succinat und Formiat nur in der stationären Phase.

Wie schon mit den Substraten Fructose und Glycerin beobachtet zeigte sich auch mit den weiteren getesteten C-Quellen keine Hydrogenase-Aktivität in der exponentiellen Wachstumsphase. Eine schwache Bande war sichtbar in auf Histidin kultivierten Proben, da diese jedoch deutlich tiefer lief als für die Banden der AH beobachtet wurde, kann von einer nicht durch die AH vermittelten Färbereaktion ausgegangen werden (Abbildung 3-8A). Auch in der stationären Phase war diese Bande in auf Histidin kultivierten Proben sichtbar, eine der AH zuzuordnende Aktivität zeigte sich jedoch für keine der untersuchten C-Quellen (Abbildung 3-8B). Somit kann die Aktivität der AH ausschließlich in der stationären Wachstumsphase bei Kultivierung auf den Substraten Fructose und Glycerin beobachtet werden.

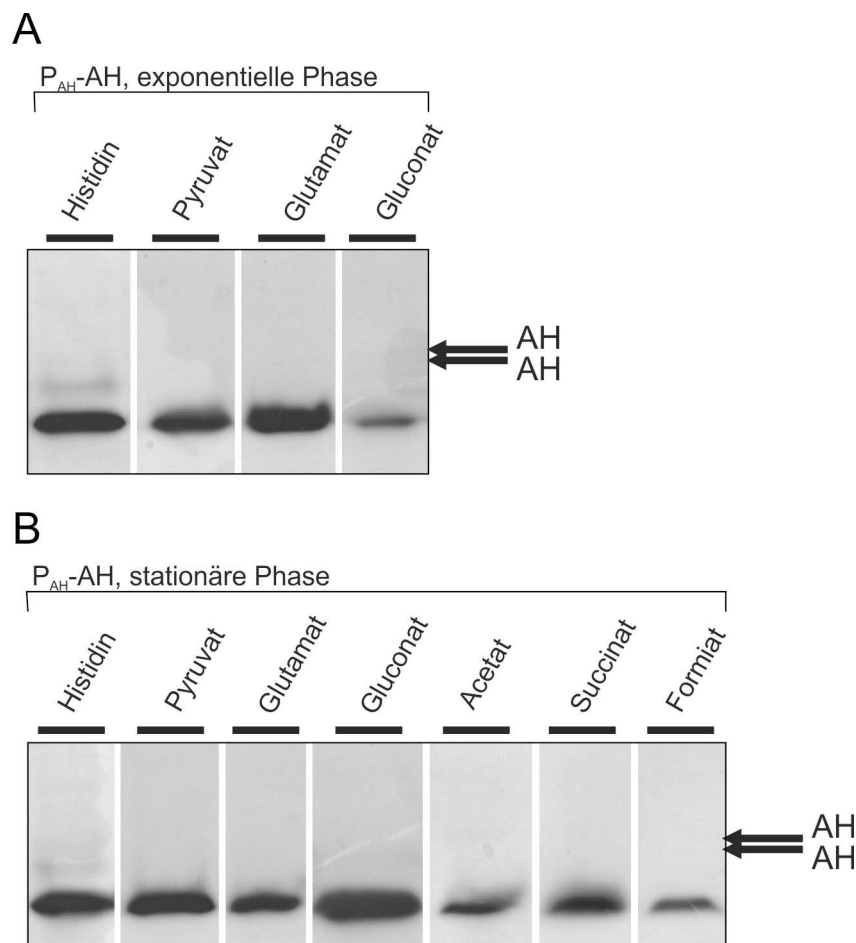


Abbildung 3-8: H₂-Oxidationsaktivität der AH in nativen Gelen in verschiedenen C-Quellen im Stamm HF500 (P_{AH}-AH) während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die löslichen Extrakte wurden mittels CN-PAGE aufgetrennt, die Hydrogenasebanden wurden im Anschluss anhand ihrer H₂-abhängigen NBT-Reduktionsaktivität sichtbar gemacht. A) H₂-Oxidationsaktivität der AH während der exponentiellen Wachstumsphase von *R. eutropha* auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. B) H₂-Oxidationsaktivität der AH bei Kultivierung in verschiedenen C-Quellen in der stationären Wachstumsphase.

3.2.3.3 Aktivität der AH bei Kultivierung mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Analog zu den Untersuchungen an den Transkripten der Gene *hofK* und *hypC2* des AH-Operons (Kapitel 3.2.2.2) wurden auch auf der Ebene der Aktivitäten Untersuchungen zur

Auswirkung verringerter Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. Es wurden Proben des Stammes HF500 (P_{AH} -AH) aus der stationären Wachstumsphase verwendet.

Es zeigte sich, dass die höchste Aktivität in den unter 20 % und 40 % Kolbenfüllung kultivierten Proben vorlag. In den mit 60 % und 80 % Füllhöhe kultivierten Proben wurden deutlich verringerte Aktivitäten gefunden (Abbildung 3-9A). Damit ergab sich auf Ebene der Aktivitäten mit Ausnahme des Unterschieds zwischen den Proben mit 20 % und 40 % Füllhöhe dieselbe Abstufung, wie sie auch mittels RT-qPCR für die Transkriptmengen ermittelt worden war. Der genannte Unterschied zwischen den Ergebnissen auf den Ebenen der Transkripte und der Proteinaktivität könnte auf einen posttranskriptionalen Effekt der Sauerstoffkonzentration hindeuten, oder beruht lediglich auf Ungenauigkeiten der Methoden.

Da die Ergebnisse der RT-qPCR an bis zu einer OD_{436} von 8 kultivierten Proben gewonnen wurden, mussten auch die Aktivitäten der AH bei $OD_{436} = 8$ untersucht werden, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. In diesen Proben wurden wie erwartet sichtbar geringere Aktivitäten gefunden. Die Abstufung der Aktivitäten bei den getesteten Füllhöhen entsprach jedoch weitestgehend derjenigen, die in den Proben aus der stationären Phase ermittelt worden war (Abbildung 3-9B).

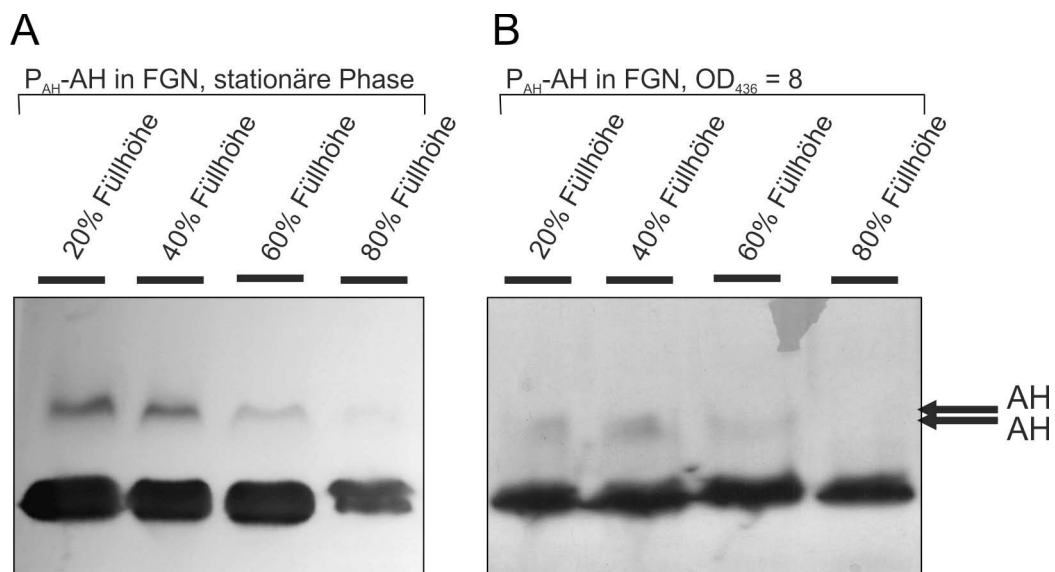


Abbildung 3-9: H₂-Oxidationsaktivität der AH bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Der Stamm *R. eutropha* HF500 (P_{AH} -AH) wurde in verschieden hoch mit Nährmedium befüllten Schüttelkolben angezogen, um unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in der Kultur zu erzielen. Die löslichen Extrakte wurden mittels CN-PAGE aufgetrennt, die Hydrogenasebanden wurden im Anschluss anhand ihrer H₂-abhängigen NBT-Reduktionsaktivität sichtbar gemacht. A) H₂-Oxidationsaktivität bei Kultivierung bis in die stationäre Wachstumsphase. B) H₂-Oxidationsaktivität bei Kultivierung bis in die exponentielle Wachstumsphase ($OD_{436} = 8$).

3.2.4 Die AH kann durch die im eigenen Operon codierten Reifungsfaktoren vollständig maturiert werden, wird aber wahrscheinlich teilweise auch durch die im MBH- oder SH-Operon codierten Reifungsfaktoren maturiert

Im Operon der AH finden sich die Gene aller zur Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen benötigten spezifischen Reifungsfaktoren. Diese stellen zusätzliche Kopien zu den in den Operons der MBH und der SH codierten Maturationsfaktoren dar. Daher stellte sich die Frage, ob die Produkte der Maturationsgene des AH-Operons ausreichen um funktionelle AH zu bilden. Um hierzu einen Hinweis zu erhalten wurde der Wasserstoffverbrauch lebender Kulturen des Stammes HF500 (P_{AH} -AH) mit dem Wasserstoffverbrauch eines Stammes verglichen, in dem zusätzlich sämtliche Maturationsgene des MBH- und SH-Operons deletiert worden waren. Dazu wurde der Stamm HF579 ($\Delta hypA1B1F1CDEX$, $\Delta hypA2B2F2$, $\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$; MBH⁻, SH⁻; Buhrke, 2002) eingesetzt. Die AH kann in diesem Stamm nur dann funktional gebildet werden, wenn sie durch die im eigenen Operon codierten Reifungsfaktoren HypF3, HypC2, HypD2, HypE2, HypA3 und HypB3 maturiert werden kann. In FGN-Medium bis in die spätexponentielle Phase (OD_{436} ca. 10) gewachsene Kulturen dieser Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 800 ppm H_2 in Luft gesetzt; die Zusammensetzung der Atmosphäre wurde in 30-60 min-Intervallen gaschromatographisch bestimmt.

Für beide Stämme zeigte sich eine Abnahme der Wasserstoffkonzentration während der Messung, welche im Stamm HF500 stärker war als im Stamm HF579 (Abbildung 3-10). Die Wasserstoffaufnahmeaktivität wurde aus den H_2 -Verbrauchskurven berechnet. Es ergab sich ein Wert von $0,050 \pm 0,002$ U/(1000 OD·ml) für HF500 und eine Aktivität von $0,020 \pm 0,003$ U/(1000 OD·ml) für den Stamm HF579. Dieser Wert beträgt somit 40 % der für HF500 bestimmten Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass die Maturationsfaktoren des AH-Operons in der Lage sind, die AH vollständig zu maturieren, diese Aufgabe aber zum Teil auch durch die Maturationsfaktoren des MBH- und SH-Operons übernommen wird.

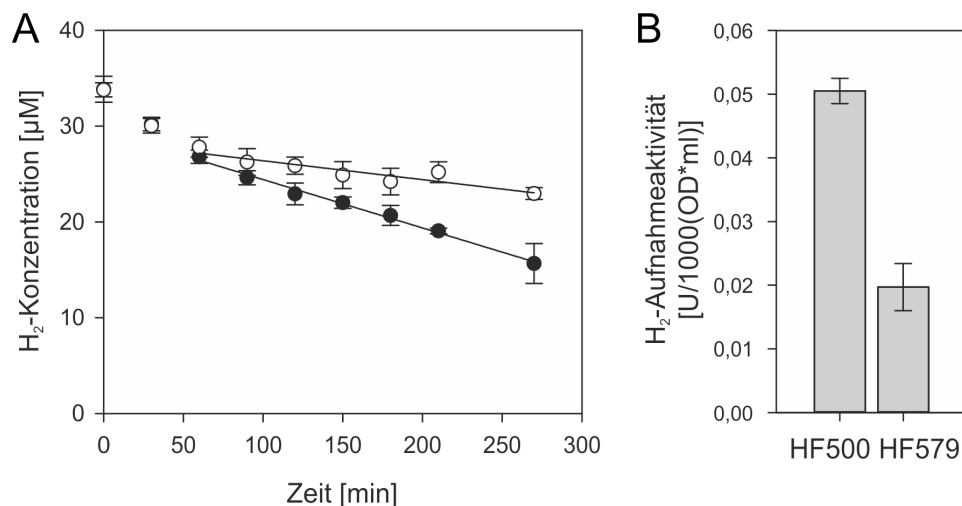


Abbildung 3-10: A) *In-vivo* Wasserstoffverbrauch der Stämme HF500($\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$, $\Delta hoxC$; MBH⁻, SH⁻, RH⁻, P_{AH} -AH; gefüllte Kreise) und HF579 ($\Delta hypA1B1F1CDEX$, $\Delta hypA2B2F2$, $\Delta hoxG$, $\Delta hoxH$; offene Kreise) und Regressionsgeraden für die Ermittlung der *in-vivo*-Aktivitäten. Bis ca. zu einer OD_{436} von 10 gewachsene Flüssigkulturen der genannten Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 800 ppm H_2 in Luft gesetzt. Der Wasserstoffgehalt der Gasphase wurde in regelmäßigen Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt. B) Ermittelte *in-vivo*-Aktivitäten aus A).

3.2.5 Die AH schleust Elektronen in die aerobe Atmungskette ein, aber kann kein lithoautotrophes Wachstum vermitteln

3.2.5.1 Die AH ist nicht in der Lage, lithoautotrophes Wachstum von *R. eutropha* zu vermitteln

Da unter den Bedingungen, die für die Expression der MBH und SH verwendet werden, auch aktive AH gebildet wird, wurden Versuche unternommen, um Aussagen über die physiologische Rolle der AH in *Ralstonia eutropha* zu erhalten. Hierzu wurde untersucht, ob die H₂-Aufnahmeaktivität der AH ausreicht, um das Wachstum von *R. eutropha* unter lithoautotrophen Bedingungen mit CO₂ als Kohlenstoffquelle und H₂ als Energielieferant zu ermöglichen. Der Stamm HF500 (P_{AH}-AH) wurde auf Agarplatten ohne Kohlenstoffquelle unter einer Gasatmosphäre mit CO₂ und H₂ inkubiert. Dabei wurde jedoch kein Wachstum von *R. eutropha* nachgewiesen. Bei Kultivierung auf der für *R. eutropha* schlecht verwertbaren Kohlenstoff- und Energiequelle Glycerin bewirkte die Zugabe von CO₂ und H₂ (mixotrophe Wachstumsbedingungen) zudem kein verbessertes Wachstum.

3.2.5.2 Die Aktivität der AH in lebenden Zellen führt zu signifikantem Wasserstoffverbrauch, die Aktivität der RH hingegen nicht

Aufgrund der Ergebnisse von Kapitel 3.2.5.1 stellte sich die Frage, ob die AH wie die MBH oder die SH eine energiekonservierende Hydrogenase ist, oder ob es sich analog zur RH um ein eventuell regulatorisches Protein handeln könnte. Der entscheidende Unterschied ist hierbei, ob die bei der Oxidation von Wasserstoff freigesetzten Elektronen in die Elektronentransportkette eingeschleust werden, oder ob H₂ gespalten wird, um im physiologischen System eine Regulationsantwort auszulösen. Im ersten Fall wird ein Elektronenakzeptor benötigt, der die Elektronen für eine Elektronentransportkette bereitstellt; in lebenden Zellen müsste kontinuierlich Wasserstoff verbraucht werden. Im zweiten Fall jedoch sollte theoretisch eine endliche Anzahl an H₂-Molekülen ausreichen, um einen Regulationsmechanismus in Gang zu setzen (Gebler *et al.*, 2007). Dabei wird vermutlich auch ein Elektronenakzeptor benötigt, jedoch wurde eine Weitergabe dieser Elektronen in eine Elektronentransportkette bislang nicht nachgewiesen (Ganskow, 2012). Daher wurde der Wasserstoffverbrauch lebender Kulturen des Stammes HF864 (P_{MBH}-AH) mit der Wasserstoffaufnahme der Stämme HF867 (AH⁻, MBH⁺), HF868 (AH⁻, RH⁺) und HF869 (AH⁻, SH⁺) verglichen, in denen jeweils nur eine einzelne Hydrogenase funktional gebildet wurde. Hierzu wurden in FGN-Medium bis in die spätexponentielle Phase (OD₄₃₆ ca. 10) gewachsene Kulturen dieser Stämme in eine Atmosphäre von 2 % H₂ in Luft überführt und nachfolgend die H₂-Konzentration der Atmosphäre in 30-60 min-Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt. Die erhaltenen H₂-Verbrauchskurven sind in Abbildung 3-11A dargestellt.

Der lebenden Kulturen der Stämme HF867 und HF869 zeigten einen hohen H₂-Verbrauch, wie für Stämme erwartet, in denen funktionale MBH bzw. SH gebildet wird. Dabei wurde für den SH-enthaltenden Stamm HF869 die höchste H₂-Oxidationsrate beobachtet. Der Stamm HF868, welcher ausschließlich die RH enthielt, und dieses Enzym unter den gewählten Wachstumsbedingungen funktionell produziert, verhielt sich in diesem Experiment entsprechend dem Hydrogenase-freien Stamm HF866 und zeigte keinen messbaren Verbrauch von Wasserstoff. Die H₂-Oxidationsaktivität der RH in diesen Proben wurde in löslichen Extrakten mittels Aktivitätsfärbung in nativen Gelen mit PMS und NBT als

Elektronenakzeptor bzw. Färbereagenz nachgewiesen (Abbildung 3-11B). Im Stamm HF864, der die überproduzierte AH enthält, wurde wie auch schon in Kapitel 3.1.1 beschrieben ebenfalls ein deutlicher Wasserstoffverbrauch gemessen. Dieses Experiment liefert somit einen ersten Hinweis darauf, dass die AH wie die MBH und die SH Elektronen in eine Elektronentransportkette einschleust.

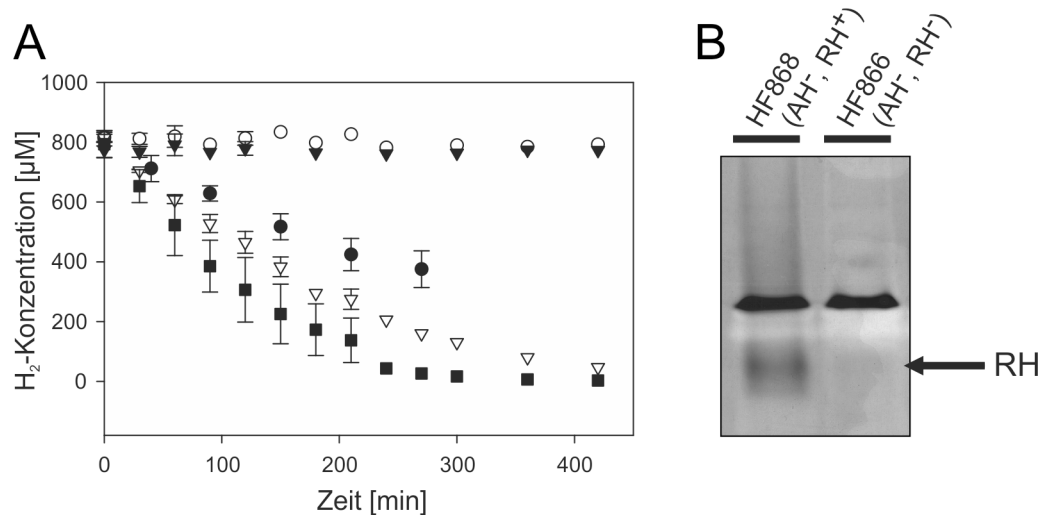


Abbildung 3-11: A) *In-vivo* Wasserstoffverbrauch der Stämme HF864 (P_{MBH} -AH; gefüllte Kreise), HF866 (AH⁻; offene Kreise), HF867 (AH⁻, MBH⁺; offene Dreiecke), HF868 (AH⁻, RH⁺; gefüllte Dreiecke) und HF869 (AH⁻, SH⁺; gefüllte Quadrate). Bis ca. zu einer OD_{436} von 10 gewachsene Flüssigkulturen der genannten Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 2 % H₂ in Luft gesetzt. Der Wasserstoffgehalt der Gasphase wurde in regelmäßigen Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt. B) Aktivitätsfärbung der RH im nativen Gel. Die aus den für die Gaschromatographie verwendeten Zellen wurden die löslichen Extrakte gewonnen und einer CN-PAGE unterzogen. Die H₂-Oxidationsaktivität der RH wurde im Gel durch Aktivitätsfärbung mit PMS/NBT sichtbar gemacht.

3.2.5.3 Der AH-vermittelte Wasserstoffverbrauch lebender Kulturen ist strikt an die Anwesenheit von Sauerstoff gekoppelt

Um weitere Informationen über den Elektronentransportweg der AH zu erhalten wurde der Wasserstoffverbrauch lebender Kulturen des Stammes HF864 (P_{MBH} -AH) in An- und Abwesenheit von Sauerstoff in der Gasphase bestimmt. Falls eine Übertragung der von der AH bereitgestellten Elektronen über eine aerobe Elektronentransportkette auf Sauerstoff stattfindet, dürfte in Abwesenheit von Sauerstoff kein Wasserstoff mehr verbraucht werden. Um experimentelle Daten zu diesem Thema zu erhalten, wurden in FGN-Medium bis in die spätexponentielle Phase (OD_{436} ca. 10) gewachsene Kulturen dieses Stammes unter eine Atmosphäre von 0,3 % H₂ in Luft bzw. N₂ gesetzt; die Zusammensetzung der Atmosphäre wurde in 30-60 min-Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt.

In den Proben mit Sauerstoff in der Atmosphäre wurde der zugegebene Wasserstoff erwartungsgemäß verbraucht. In denjenigen Proben jedoch, die von Beginn an keinen Sauerstoff enthielten, blieb der H₂-Gehalt in der Atmosphäre konstant (Abbildung 3-12A). Wurde zu den O₂-freien Proben jedoch Sauerstoff zugegeben, konnte ein sofort einsetzender Verbrauch von Wasserstoff festgestellt werden (Abbildung 3-12B). Daraus wurde der Schluss

gezogen, dass in aerob gewachsenen Kulturen von *R. eutropha* der Verbrauch von Wasserstoff durch die AH ausschließlich in Gegenwart von Sauerstoff möglich ist. Entsprechende Experimente mit der MBH sollten zu einem ähnlichen Ergebnis führen, da die Kopplung dieser an die aerobe Atmungskette auf anderem Wege nachgewiesen wurde (Podzuweit *et al.*, 1986).

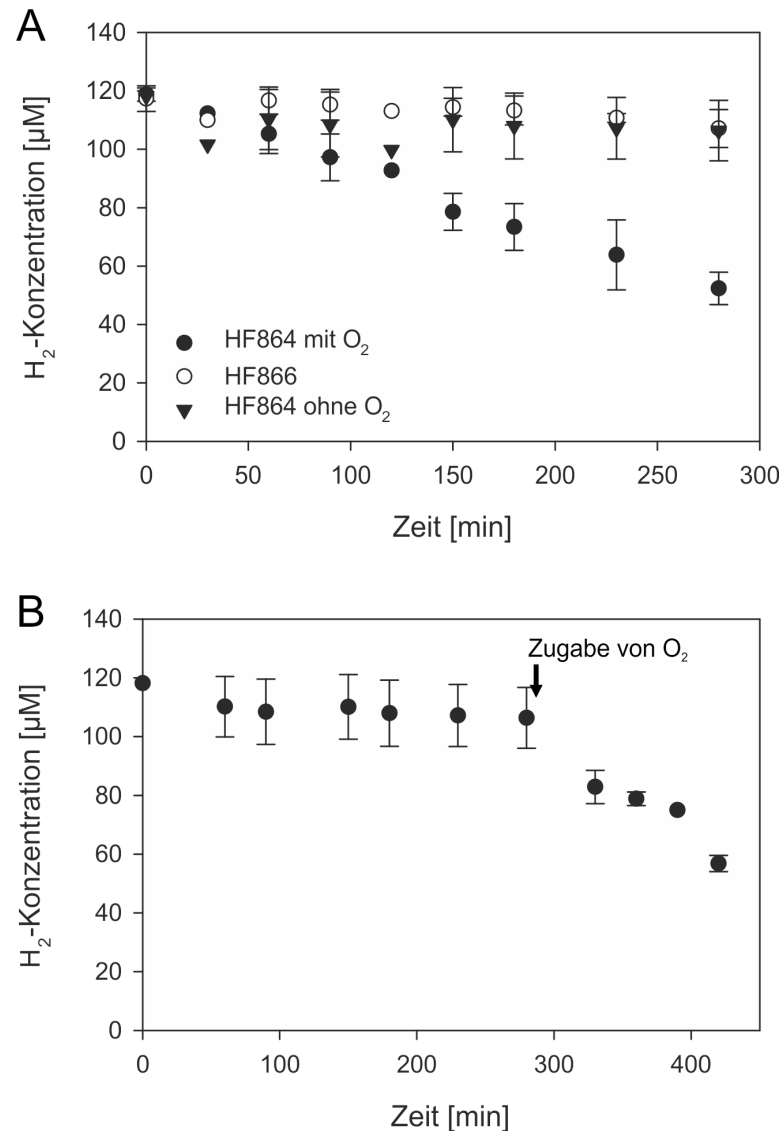


Abbildung 3-12: A) *In-vivo*-Wasserstoffverbrauch des Stammes HF864 (P_{MBH-AH}) mit Sauerstoff (gefüllte Kreise) und ohne Sauerstoff (gefüllte Dreiecke) in der Atmosphäre, sowie des Stammes HF866 (AH; offene Kreise). Bis ca. zu einer OD_{436} von 10 gewachsene Flüssigkulturen der genannten Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 0,3 % H₂ in Luft gesetzt. Der Wasserstoffgehalt der Gasphase wurde in regelmäßigen Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt. B) *In-vivo* Wasserstoffverbrauch des Stammes HF864 (P_{MBH-AH}) vor und nach Zugabe von Sauerstoff in die Probenatmosphäre.

3.2.5.4 Die AH ist für ihre *in-vivo*- H₂-Aufnahmeaktivität auf funktionale terminale Oxidasen in *R. eutropha* angewiesen

Wenn die AH in *R. eutropha* strikt an die aerobe Atmungskette gekoppelt ist, wie die vorhergehenden Versuche nahelegen, muss eine Unterbrechung der Atmungskette zur Beendigung des Wasserstoffverbrauches einer Kultur führen. Daher wurde untersucht, wie sich die Hemmung der terminalen Oxidasen von *R. eutropha* durch Kaliumcyanid auf den H₂-Verbrauch einer Kultur des Stammes HF864 (P_{MBH}-AH) auswirkt. In Vorversuchen war eine Konzentration von ca. 1 mM KCN ermittelt worden, um das Wachstum einer Kultur mit der OD₄₃₆ von 1 vollständig zu inhibieren. Für die H₂-Aufnahmeexperimente an Kulturen mit einer OD₄₃₆ von ca. 10 wurde deshalb eine Konzentration von 20 mM KCN gewählt. Bei dieser Konzentration von KCN ist die H₂-Oxidationsaktivität der isolierten AH im spektrophotometrischen Assay gegenüber der cyanidfreien Probe nahezu unverändert. Ein deutlicher Effekt auf die Wasserstoffaufnahme des Stammes war sofort erkennbar. Auch nach einer Messzeit von 23 h wurde in Anwesenheit von KCN eine weitgehend konstant gebliebene Wasserstoffkonzentration detektiert, während in cyanidfreien Vergleichsproben kein Wasserstoff mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-13).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen deutlich, dass die durch die Reaktivität der AH freigesetzten Elektronen in die aerobe Atmungskette eingeschleust werden. Für diesen Vorgang wird somit ein Elektronenakzeptor benötigt, der die AH im physiologischen System mit der weiteren Elektronentransportkette verbindet. Dieser Akzeptor muss noch identifiziert werden (Abschnitt 3.6.1.1).

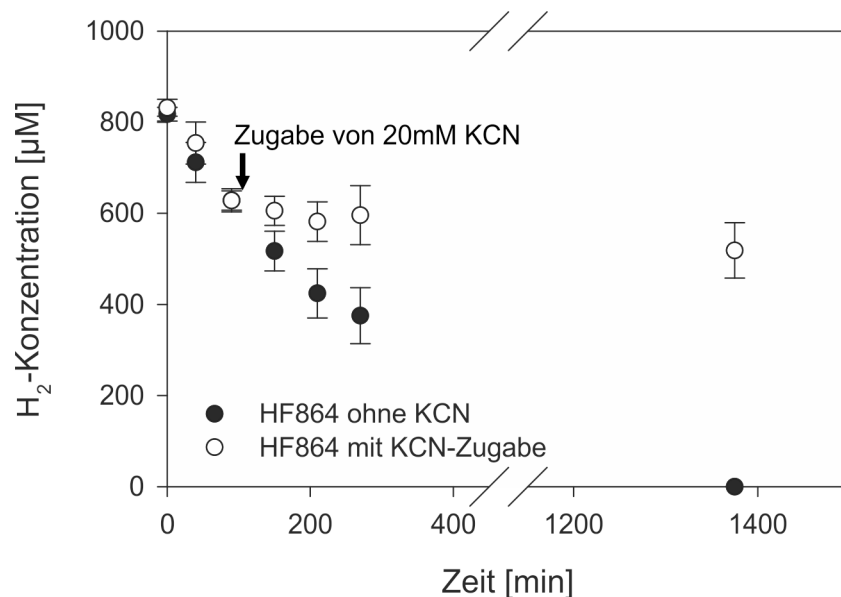


Abbildung 3-13: *In-vivo* Wasserstoffverbrauch von Kulturen des Stammes HF864 (P_{MBH}-AH) ohne KCN (gefüllte Kreise) und mit Zugabe von 20 mM KCN nach 90 min Messzeit (offene Kreise). Bis ca. zu einer OD₄₃₆ von 10 gewachsene Flüssigkulturen der genannten Stämme wurden unter eine Atmosphäre von 2 % H₂ in Luft gesetzt. Der Wasserstoffgehalt der Gasphase wurde in regelmäßigen Intervallen mittels Gaschromatographie bestimmt.

3.3 Reinigung der AH aus *R. eutropha*

3.3.1 Reinigung der AH aus dem Stamm *R. eutropha* HF901

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wird die AH in löslichen Zellextrakten gefunden. Um eine detaillierte biochemische Charakterisierung der AH durchführen zu können, musste das Protein aus den löslichen Zellextrakten isoliert werden. Hierfür erschien die *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie (Skerra & Schmidt, 2000) am besten geeignet, da diese eine einstufige, gegenüber vielen Substanzen unempfindliche Methode darstellt. Reinigungen von Hydrogenasen aus *R. eutropha* mittels dieser Methode sind bereits seit längerem etabliert (Jones *et al.*, 2004; Burgdorf *et al.*, 2005b; Schubert *et al.*, 2007). Damit das reine Enzym mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie möglichst einfach erhalten werden konnte, wurde ausgehend von dem Stamm *R. eutropha* HF864 (P_{MBH} -AH) der Stamm HF901 (P_{MBH} -AH_{*Strep*}) dargestellt. Die Konstruktion dieses Stammes ist in Kapitel 2.13.4 beschrieben. In diesem Stamm wurde die AH mit einem *Strep*-Affinitätspeptid modifiziert und steht unter Kontrolle des MBH-Promoters.

In einer ersten Testreinigung dieses Stammes wurden 10 g Zellen eingesetzt, die in FGN-Medium bis zur stationären Phase kultiviert worden waren. Diese Reinigung erfolgte bei pH 7 und 150 mM NaCl mit einem Volumen von 0,5 ml *Strep*-Tactin Affinitätsmatrix. Die Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und durch Coomassie-Färbung die enthaltenen Proteinbanden sichtbar gemacht. Deutlich sichtbar waren zwei Banden, welche im Eluat des Kontroll-Stammes HF864 (P_{MBH} -AH) nicht vorhanden waren. Die Molekülmassen der zwei Banden wurden anhand des Größenstandards zu ca. 37 kDa und ca. 65 kDa abgeschätzt, was gut mit den aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Massen der großen und kleinen Untereinheit der AH mit 37,8 kDa und 65,4 kDa (mit C-terminaler Prozessierung) korreliert (Abbildung 3-14A). Allerdings war noch eine große Zahl weiterer Banden im Hintergrund vorhanden, sodass eine Optimierung des Protokolls angestrebt wurde.

Die Fraktionen der Testreinigung wurden ebenfalls durch CN-PAGE und Hydrogenase-Aktivitätsfärbung mit PMS und NBT analysiert. Im löslichen Extrakt wurden etwa gleich starke Banden der verglichenen Stämme gefunden; im Eluat der Affinitätssäule wurde für den Stamm HF901 (P_{MBH} -AH_{*Strep*}) eine sehr starke Bande gefunden, während das Eluat des Stammes HF864 (P_{MBH} -AH) keinerlei Aktivität aufwies. In Übereinstimmung dazu wurde im Durchlauf der Affinitätssäule für den Stamm HF901 (P_{MBH} -AH_{*Strep*}) eine im Vergleich zum löslichen Extrakt deutlich schwächere Bande beobachtet; der Durchlauf des Stammes HF864 (P_{MBH} -AH) zeigte eine Bandenintensität, die mit der für den löslichen Extrakt vergleichbar ist (Abbildung 3-14B).

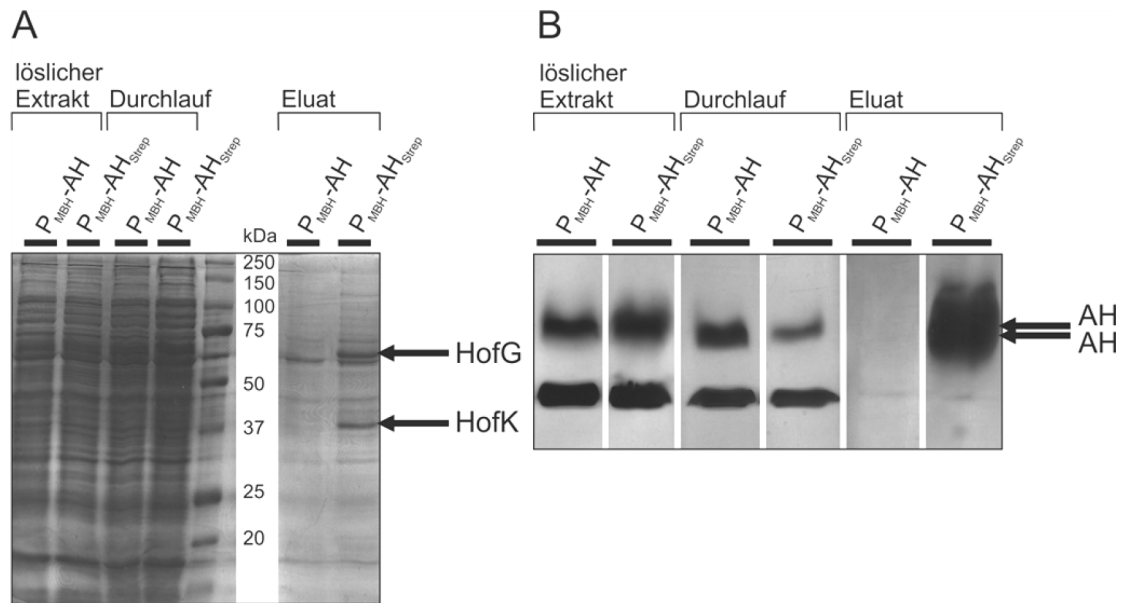


Abbildung 3-14: Testreinigung der AH aus dem Stamm HF901 ($P_{MBH-AH_{Strep}}$). Als Kontrolle diente der Stamm HF864 (P_{MBH-AH}). Aus in FGN-Medium bis zur stationären Phase kultivierten Zellen wurden die löslichen Extrakte gewonnen und einer *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Die löslichen Extrakte, die Durchläufe und Eluate der Affinitätschromatographie wurden durch SDS-PAGE und CN-PAGE aufgetrennt. A) SDS-PAGE mit Coomassiefärbung. B) CN-PAGE mit Anfärbung der H_2 -Oxidationsaktivität durch PMS und NBT.

Eine höhere Reinheit der AH konnte erzielt werden, indem größere Volumina an *Strep*-Tactin Matrix verwendet wurden und die Säulen mit einem größeren Volumen an Waschpuffer mit pH 7,2 gewaschen wurden. Nach Reinigungen gemäß diesem Protokoll wurden in Coomassiegefärbten SDS-Gelen stets 4-5 Banden gefunden. Neben den als große und kleine Untereinheit der AH identifizierten Banden traten Banden mit ungefähren Größen von 130 kDa, 70 kDa und 60 kDa auf (Abbildung 3-15). Die Banden bei 60 kDa und 70 kDa waren bereits zuvor beschrieben worden als Proteine aus *R. eutropha*, die ebenfalls gut an die *Strep*-Tactin-Matrix binden (Jones *et al.*, 2004). Diese waren als das Chaperon DnaK und Propionyl-CoA(S)-methyl-malonyl-CoA-carboxylase identifiziert worden. Die Bande bei 130 kDa, die teilweise nur sehr schwach sichtbar war, stammt von einem bislang nicht identifizierten Protein. Die genannten Verunreinigungen konnten mit der Standard-Reinigungsprozedur nicht entfernt werden. Für die meisten der nachfolgend beschriebenen Experimente war die Reinheit der mit dieser Methode gewonnenen AH trotzdem ausreichend, da von den Verunreinigungen keine Beeinflussung der Messungen zu erwarten war. Die durchschnittliche Ausbeute im Eluat lag bei 0,7 mg Protein pro 10 g eingesetzter Zellmasse.

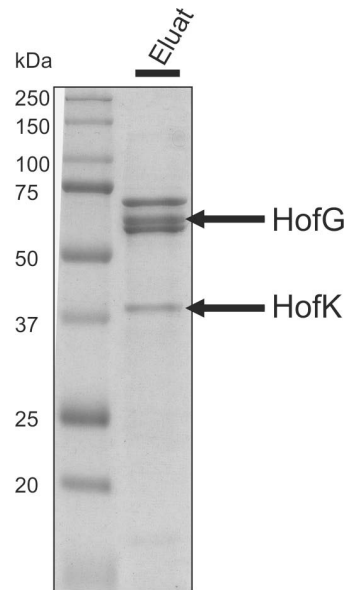


Abbildung 3-15: SDS-PAGE des Eluats der *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie aus der Reinigung des Stammes HF901 (P_{MBH} -AH_{*Strep*}). Die löslichen Extrakte von in FGN-Medium bis zur stationären Phase kultivierten Zellen wurden einer *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbestandteile durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.3.2 Mit Hilfe eines optimierten Protokolls kann homogenes AH-Protein isoliert werden

Da die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Methode keine optimale Reinheit der AH lieferte, wurde ein Protokoll etabliert, welches die Abtrennung der Verunreinigungen gewährleistet. Hierzu wurde die Tatsache ausgenutzt, dass eine starke Bindung des *Strep*-Tags II an die *Strep*-Tactin-Matrix nur oberhalb von pH 7 stattfindet. Daher war es möglich, das AH_{*Strep*}-Protein nach der Bindung an die Matrix bei pH 7,2 mit einem pH unter 7 von der Säule zu waschen. Die Verunreinigungen verblieben dabei an der *Strep*-Tactin-Matrix. Demzufolge konnte die AH aus der Waschfraktion nach Erhöhung des pH-Wertes über eine zweite *Strep*-Tactin-Säule isoliert werden.

Durch dieses zweistufige Verfahren gelang es, die Verunreinigungen, welche offenbar stärker an die *Strep*-Tactin Matrix binden als das AH_{*Strep*}-Protein, vom Zielprotein abzutrennen. Im Eluat der ersten Säule wurden dementsprechend die drei Banden mit den Größen 130 kDa, 70 kDa und 60 kDa mit geringen Restanteilen der AH gefunden; das Eluat der zweiten Säule enthielt die Banden der großen und kleinen Untereinheit der AH ohne signifikante Reste der übrigen Proteine (Abbildung 3-16). In dieser Probe waren durchschnittlich 0,3 mg AH pro 10 g Zellen enthalten. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass in den Eluaten der einstufigen Reinigungsmethode etwa 40-50 % des Proteingehalts auf die drei Verunreinigungen zurückzuführen war, was auch beim Vergleich der Bandenintensitäten in entsprechenden SDS-PAGE-Läufen plausibel erscheint (siehe Abbildung 3-15).

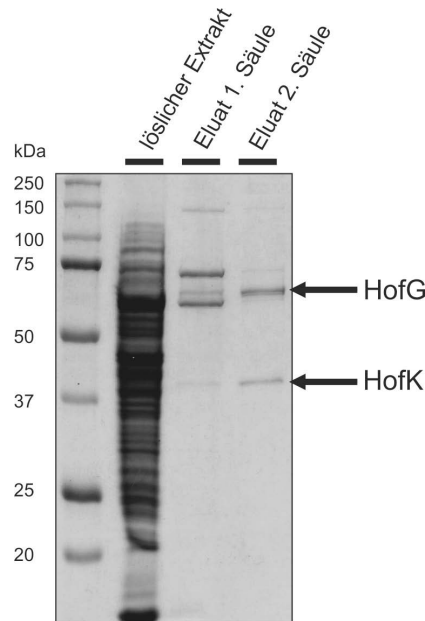


Abbildung 3-16: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Reinigung des Stammes HF901 ($P_{MBH^-}AH_{Strep}$) nach dem zweistufigen Protokoll. Die löslichen Extrakte von in FGN-Medium bis zur stationären Phase kultivierten Zellen wurden einer *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Die erste Affinitätssäule wurde mit pH 6,7-Puffer gewaschen; die Waschfraktion wurde auf pH 7,2 eingestellt und einer erneuten *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Die Eluate beider Säulen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbestandteile durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.3.3 Die Reinigung der AH mit Hilfe eines verbesserten Überexpressionssystems führt auch mit dem originalen Protokoll zu homogenem Protein

Bei den Reinigungen des AH_{Strep} -Proteins aus dem Stamm HF901 konnte ausreichend AH isoliert werden, um viele biochemische Eigenschaften des Enzyms zu bestimmen (siehe Kapitel 3.4 und 3.6). Für die ebenfalls durchgeführten kristallographischen und spektroskopischen Experimente (Kapitel 3.5 und 3.7) wurden jedoch größere Mengen an AH benötigt, als unter Verwendung dieses Expressionssystems darzustellen gewesen wäre. Daher wurde ein neues Expressionssystem entwickelt, welches zu einer höheren Ausbeute an AH führen sollte. Hierzu wurden ausgehend von den AH-Deletionsstämmen HF865 ($P_{MBH^-}\Delta hofG$; AH^-) bzw. HF1036 ($P_{MBH^-}\Delta hofK\Delta hofG$; AH^-) die Stämme HF1035 ($P_{SH^-Strep}AH$) und HF1038 ($P_{SH^-Strep}AH$) konstruiert. Beide Stämme enthalten ein Plasmid, in dem die Gene der kleinen und der großen Untereinheit der AH, *hofK* und *hofG*, unter der Kontrolle des Promoters der löslichen Hydrogenase aus *R. eutropha* stehen. Die übrigen Gene des AH-Operons befanden sich dabei wie im Stamm HF901 ($P_{MBH^-}AH_{Strep}$) auf dem Megaplasmid pHG1 unter der Kontrolle des MBH-Promoters. Der Stamm HF1038 unterscheidet sich vom Stamm HF1035 lediglich dadurch, dass auf dem Megaplasmid pHG1 neben dem Gen *hofG* der großen Untereinheit der AH auch das Gen *hofK* der kleinen Untereinheit deletiert ist. Hierdurch sollte verhindert werden, dass ein auf pHG1 codiertes nicht modifiziertes HofK-Protein produziert wird und mit $_{Strep}HofK$ um die große Untereinheit der AH konkurriert. Die AH wurde aus beiden Stämmen nach dem einstufigen Protokoll isoliert und in identischem Reinheitsgrad und derselben Ausbeute erhalten.

Mit diesem verbesserten Überexpressionssystem konnte die Proteinausbeute auf rund 2 mg AH pro 10 g Zellen gesteigert werden. Sie lag somit gegenüber dem zuerst beschriebenen Expressionssystem um das ca. 7-fache höher. Eine maßgebliche Rolle für die Steigerung der Ausbeute spielt die Tatsache, dass bereits in Reinigungen nach dem einstufigen Protokoll die AH ohne signifikante Anteile der zuvor beschriebenen Verunreinigungen erhalten wurde (Abbildung 3-17). Durch den Einsatz eines N-terminal statt wie bisher C-terminal an die kleine Untereinheit der AH fusionierten *Strep*-Tags II wurde demzufolge eine stabilere Interaktion mit der *Strep*-Tactin-Matrix erzielt.

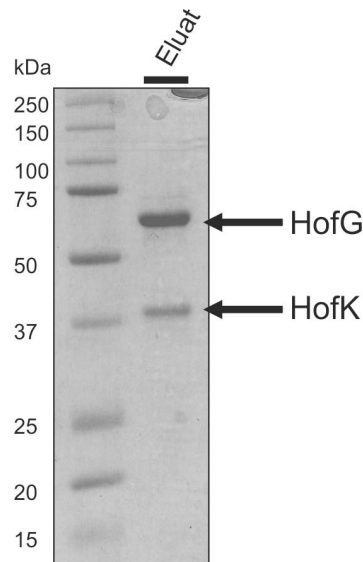


Abbildung 3-17: SDS-PAGE der Eluatfraktion aus der Reinigung des Stammes HF1035 (P_{SH}^{Strep} AH). Die löslichen Extrakte von in FGN-Medium bis zur stationären Phase kultivierten Zellen wurden einer *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbestandteile durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.3.4 Im Zuge der AH-Reinigung werden Nukleotide cogereinigt, die sich auf verschiedene Arten abtrennen lassen

Von der aus verschiedenen Präparationen erhaltenen AH wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen. Hierbei zeigte sich überraschenderweise anstatt des erwarteten Absorptionsmaximums für Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Maximum bei 260 nm, welches üblicherweise durch Nukleotide hervorgerufen wird (Abbildung 3-18). Dieses zeigte eine so hohe Absorption, dass ein mögliches Maximum bei 280 nm nicht festzustellen war. Hingegen konnte eine erhöhte Absorption im Bereich zwischen 400 nm und 420 nm beobachtet werden, welche für die Anwesenheit von [FeS]-Zentren in den Präparationen sprach. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die in den AH-Präparationen gefundenen Nukleotidverunreinigungen die durchgeführten Kristallisationsexperimente (Kapitel 3.5) beeinträchtigten, wurden Versuche unternommen, die Nukleotide aus den Proteinproben zu entfernen, sowie ein Reinigungsprotokoll zu entwickeln, durch welches die Nukleotide während der Reinigung entfernt werden.

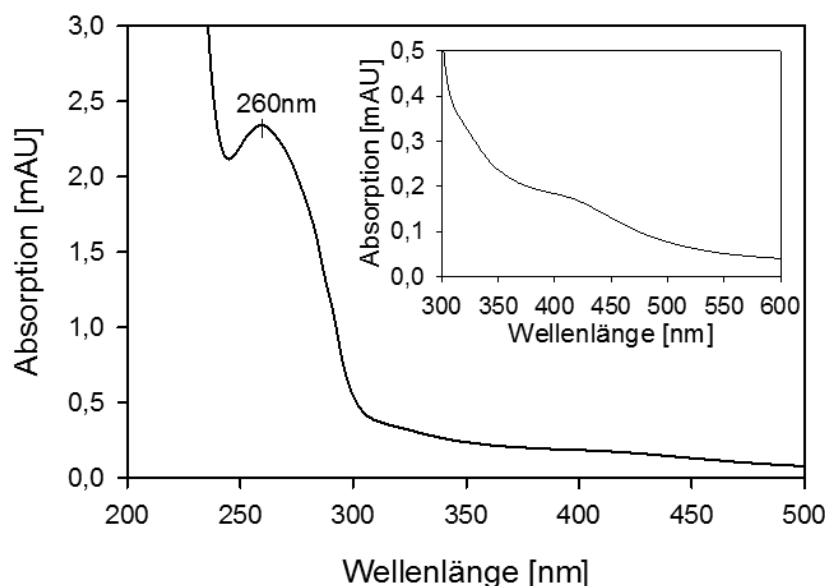


Abbildung 3-18: UV/Vis-Spektrum des gereinigten *Strep*AH-Proteins aus dem Stamm HF1035 (P_{SH} -*Strep*AH) mit in der Probe verbleibenden Nukleotiden. Die Reinigung erfolgte gemäß dem in den Kapiteln 2.5.1 und 2.5.2 beschriebenen Standardprotokoll ohne RNase. Fenster: Ausschnitt des Spektrums im Bereich der [FeS]-Cluster-Absorption.

Die Entfernung der Nukleotide aus gereinigten Proteinproben gelang mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie als zusätzlichem Reinigungsschritt. Als geeignete stationäre Phase erwies sich hierbei der schwache Anionenaustauscher Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-Sephacel). Die Auftrennung der Probe wurde kontinuierlich anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280nm}) verfolgt. Der Protein- und der Nukleotidanteil einer Probe konnten mit verschiedenen Salzkonzentrationen von der Matrix eluiert werden. Während sich die AH als überwiegender Proteinbestandteil bereits bei 100-200 mM NaCl von der Säule ablöste, wurden die Nukleotide erst bei hohen Salzkonzentrationen von über 300 mM im Eluat gefunden (Abbildung 3-19). Eine saubere Trennung gelang somit mit einem zweistufigen Salzgradienten mit 100-300 mM NaCl beziehungsweise 2 M NaCl. In den anschließend von den Fraktionen mit maximaler A_{280nm} aufgenommenen UV/Vis-Spektren wurde in der Fraktion mit der niedrigeren Salzkonzentration ein Absorptionsmaximum von 280 nm bestimmt, während die Hochsalzfraktion bei 259 nm die stärkste Absorption aufwies (Abbildung 3-20).

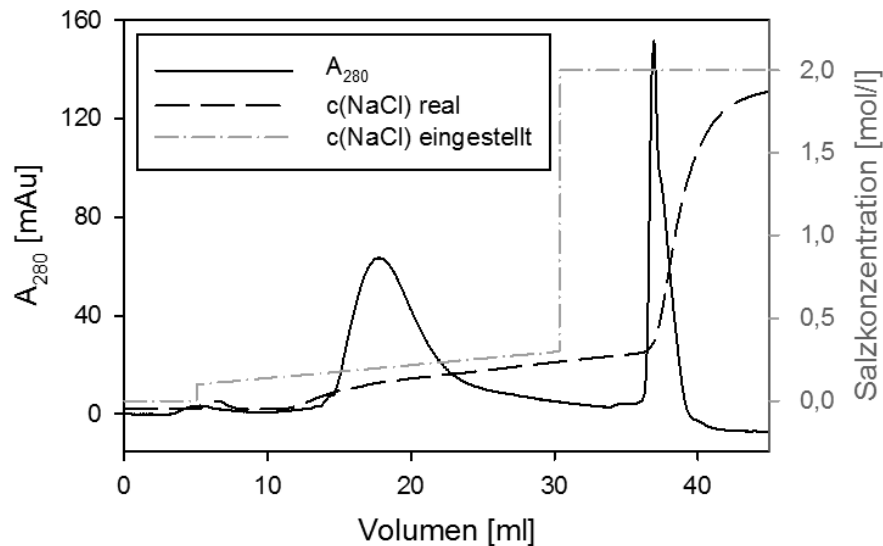


Abbildung 3-19: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie zur Abtrennung der Nukleotidbestandteile aus AH-Präparationen. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde nach dem Standardprotokoll gereinigtes AH-Protein eingesetzt.

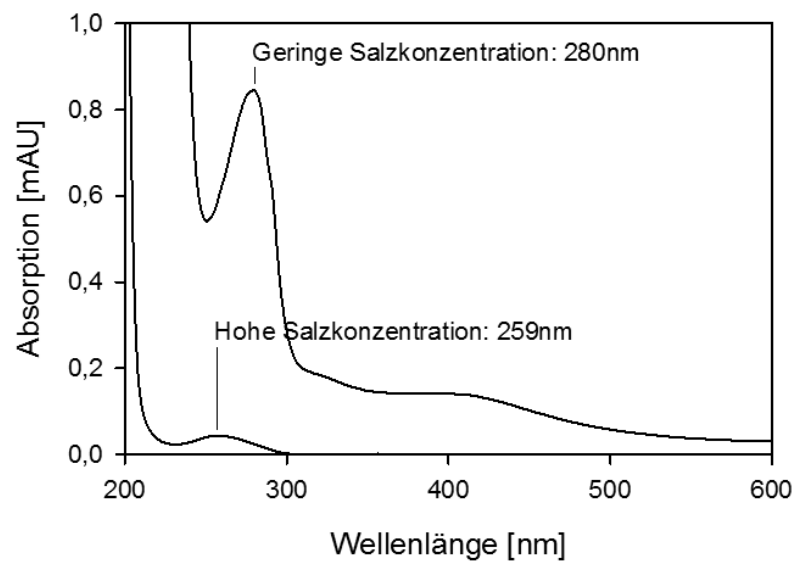


Abbildung 3-20: UV/Vis-Spektren der Maxima aus der Anionenaustauschchromatographie. Die Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie, in denen Absorption bei 280 nm detektiert wurde (15-25 ml und 35-40 ml; siehe Abbildung 3-19) wurden konzentriert und der UV/Vis-Spektroskopie unterworfen. Die geringe Restabsorption der Fraktion mit hoher Salzkonzentration ist auf die hohe Verdünnung nach der Chromatographie zurückzuführen, da eine Konzentrierung der Probe nicht möglich war.

Um die Nukleotide ohne einen weiteren Chromatographieschritt aus den Proben zu entfernen, wurde versucht, die Spezies zu identifizieren, welche die Absorption bei 260 nm verursacht. Hierzu wurden nach der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Methode gereinigte Proben mit DNase beziehungsweise RNase inkubiert. Die Analyse der so behandelten Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese und Sichtbarmachung der Nukleotide mittels eines

Fluoreszenzfarbstoffes ergab, dass in allen Proben Nukleotide vorhanden waren. Während diese sich in der DNase-behandelten und der unbehandelten Probe in Form von breit verschmierten Banden zeigten, war in der RNase-behandelten Probe nur geringe Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 3-21).

RNase-behandelte Proben wurden zudem durch Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. Nicht mit RNase behandelte Proben wiesen nach der Gelpermeationschromatographie bei $A_{280\text{nm}}$ einen Peak oder zwei ineinander übergehende Peaks auf (siehe Abbildung 3-24; Kapitel 3.4.2). UV/Vis-Spektren dieser Peaks wiesen stets Absorptionsmaxima bei etwa 260 nm auf. Im Gegensatz hierzu wurden nach Behandlung der Proben mit RNase zwei Peaks bei $A_{280\text{nm}}$ gefunden und mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Die Fraktion des ersten Peaks zeigte hierbei ein Absorptionsmaximum bei 275 nm, während in der Fraktion des zweiten Peaks nach Konzentration der Probe nur sehr geringe Absorption verblieb, welche ein Maximum bei 255 nm aufwies (Abbildung 3-22). Somit konnten die in den Proben offenbar konzentriert enthaltenen Polynukleotide durch die Zugabe von RNase zu einem großen Teil zersetzt werden, sodass dieselben sich in der Gelpermeationschromatographie abtrennen ließen und in Agarose-Gelen als niedermolekulare Bestandteile nicht mehr detektiert wurden.

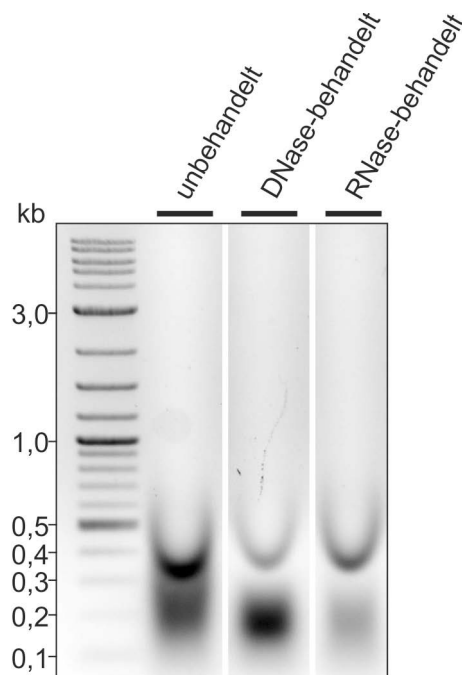


Abbildung 3-21: Nukleotid-Bestandteile unterschiedlich behandelter AH-Proben. Aus dem Stamm HF1035 nach dem Standardprotokoll gereinigte AH wurde mit DNase bzw. RNase inkubiert und über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Die Nukleotidbestandteile wurden durch Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht.

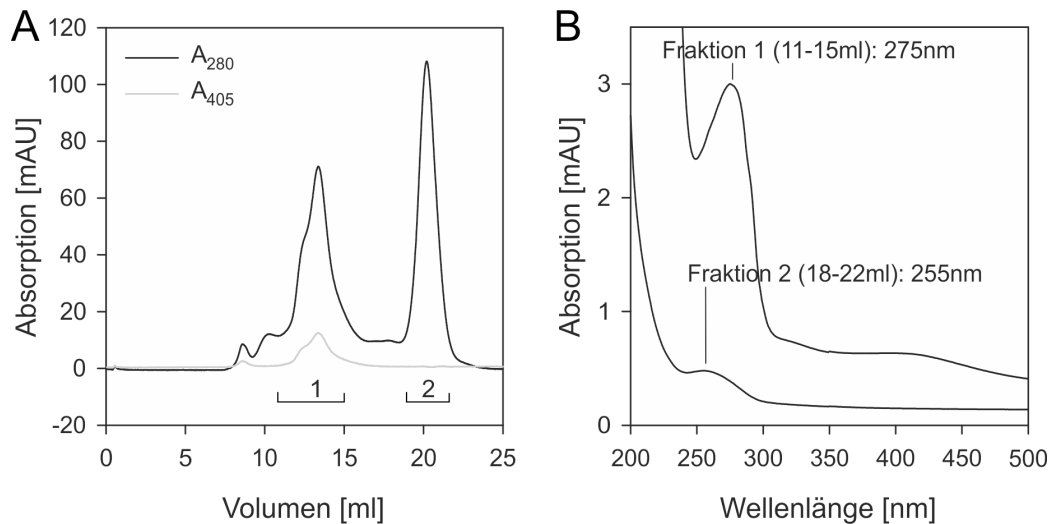


Abbildung 3-22: Gelpermeationschromatographie von mit RNase inkubierten AH-Proben. Aus dem Stamm HF1035 nach dem Standardprotokoll gereinigte AH wurde mit RNase inkubiert und durch Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. A) Lauf der Gelfiltration, verfolgt anhand der Absorption bei 280 nm (Detektion von Protein- und ggf. Nukleotidbestandteilen; schwarze Linie) und 405 nm (Detektion von [FeS]-Clustern; graue Linie). Der rechte Peak wurde ausschließlich in RNase-behandelten Proben gefunden. B) UV/Vis-Spektren der Peakfraktionen der Gelfiltration mit Wellenlänge der jeweiligen Absorptionsmaxima.

Da diese Ergebnisse auf eine Verunreinigung durch erstaunlich stabile RNAs schließen ließen, wurde für die Reinigung der AH über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie zusätzlich RNase verwendet, welche dem Grundpuffer zu Beginn der Reinigung zugesetzt wurde. Hiermit gelang es gleichermaßen, die Polynukleotidbestandteile abzutrennen, sodass die gereinigte Probe im UV/Vis-Spektrum ein Absorptionsmaximum von 275 nm aufwies (Abbildung 3-23).

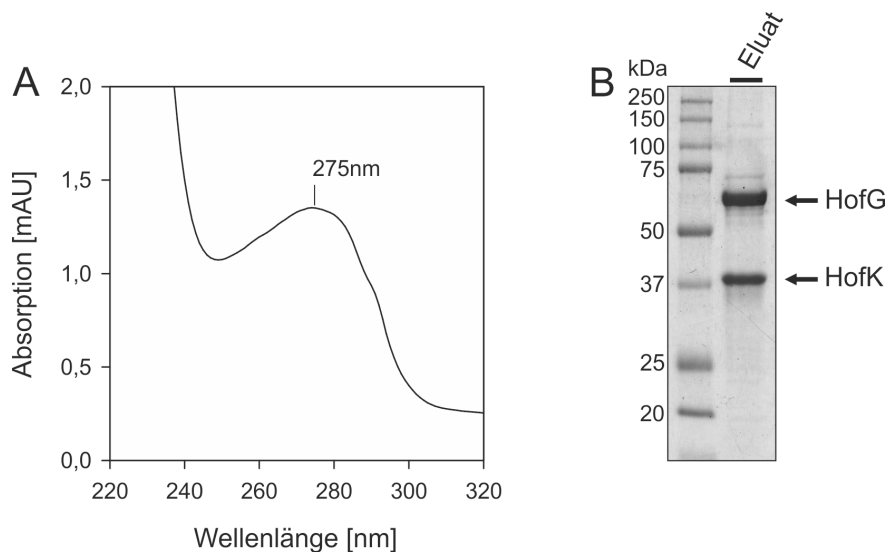


Abbildung 3-23: Einstufige Reinigung der AH unter Zugabe von RNase. Die AH wurde aus dem Stamm HF1035 nach dem Standardprotokoll unter Zugabe von RNase in die Reinigungspuffer isoliert. A) Ausschnitt des UV/Vis-Spektrums des gereinigten Proteins. B) SDS-PAGE des gereinigten Proteins. Die Proteinbestandteile wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.4 Untersuchungen zum Aufbau und den Metallcofaktoren der AH

3.4.1 Die AH besteht aus zwei Untereinheiten

Anschließend an die Präparationen der AH wurden die gewonnenen Proben mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3), wobei in den Proben mit dem höchsten Reinheitsgrad zwei Banden gefunden wurden. Die Größe dieser Banden ließ sich abschätzen auf etwa 37 kDa bzw. etwa 65 kDa, was den aus den Gensequenzen berechneten Größen der großen und kleinen Untereinheit entspricht. Die reine, katalytisch aktive AH besteht demzufolge aus genau den zwei in ihrem Operon codierten Untereinheiten. Falls die zwei Untereinheiten der AH *in vivo* in einem Komplex mit weiteren Proteinen vorliegen, wird dieser Komplex spätestens bei der Reinigung über Affinitätschromatographie gelöst, sodass mögliche zusätzliche Proteine eines Komplexes verloren gehen.

3.4.2 Die AH kommt in einer Mischung aus monomerer und dimerer Form vor

Zur Bestimmung der Größe der AH in ihrer nativen Form wurden durch Affinitätschromatographie gereinigte Proben mittels Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. Die Auftrennung wurde bei 280 nm und 405 nm verfolgt, um Proteinbestandteile bzw. das Vorkommen von [FeS]-Clustern zu detektieren. Dabei wurden bei beiden Wellenlängen übereinstimmend zwei Maxima gefunden; in einigen Proben war das eine Maximum jedoch nur als Schulter des anderen Maximums erkennbar (Abbildung 3-24; vgl. auch Abbildung 3-22A).

Die molekulare Masse der Proteine in beiden Maxima wurde durch Vergleich mit einer Eichreihe von Proteinen mit bekannter molekularer Masse ermittelt. Für die beiden Maxima wurden Größen von 144 ± 7 kDa bzw. 290 ± 45 kDa berechnet. Dem einen Maximum kann somit die zweifache Masse des anderen Maximums zugeordnet werden. Die Analyse der zwei Peaks durch SDS-PAGE zeigte für beide Peaks eine identische Proteinzusammensetzung bestehend aus den zwei Untereinheiten der AH, was für ein aus HofK und HofG bestehendes Monomer der AH sowie die dimere Form davon spricht. Die Fraktionen beider Peaks wurden jeweils einzeln nochmals durch Gelpermeationsschromatographie aufgetrennt. In der Größenanalyse der Maxima in beiden Proben wurde lediglich der Peak gefunden, der der molekularen Masse von ca. 144 kDa entspricht; der größere Peak fehlte. Diese Beobachtung sowie die Tatsache, dass die beiden Peaks in unterschiedlichen Proben in verschiedenen Anteilen gefunden wurden, spricht dafür, dass die gereinigte AH in einem Gleichgewicht aus monomerer und dimerer Form vorliegt.

Für das Monomer der AH wird in dieser Bestimmung die molekulare Masse von 144 ± 7 kDa zugeordnet, die allerdings von der berechneten Masse von 103,2 kDa abweicht. Es wurden keine Hinweise gefunden, die für die Anwesenheit eines weiteren Proteins in den untersuchten Proben sprechen. Da die Reinigung ohne RNase erfolgte kann diese Abweichung entweder auf die wahrscheinlich fest an der AH gebundenen Nukleotide (siehe Kapitel 3.3.4) oder auf die allgemeine Ungenauigkeit der Methode zurückgeführt werden.

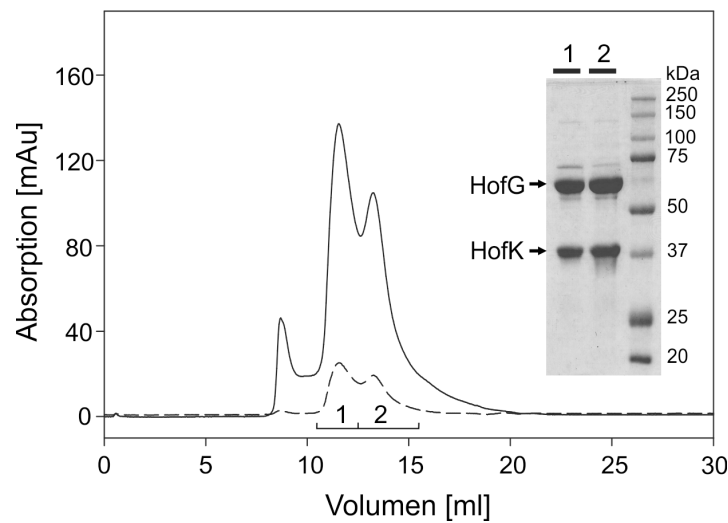


Abbildung 3-24: Gelpermeationschromatographie der AH. Aus dem Stamm HF1035 nach dem Standardprotokoll gereinigte AH wurde durch Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. Der Lauf wurde verfolgt anhand der Absorption bei 280 nm (Detektion von Protein- und ggf. Nukleotidbestandteilen; durchgezogene Linie) und 405 nm (Detektion von [FeS]-Clustern; gestrichelte Linie). Innenliegend: SDS-PAGE der zwei Peakfraktionen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbestandteile durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Das Vorkommen der AH in einer monomeren und einer dimeren Form, die nebeneinander vorliegen, erklärt auch das Auftreten einer Doppelbande, wenn eine AH-Probe in einem nativen Gel aufgetrennt und mittels Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht wird (vgl. Abbildung 3-2).

3.4.3 Sequenzanalysen der AH sagen ein [NiFe]-Zentrum sowie drei [4Fe4S]-Cluster voraus

Um Hinweise auf die in der AH enthaltenen Metallcofaktoren zu gewinnen wurden die Aminosäuresequenzen der großen und kleinen Untereinheit der AH mit den Sequenzen weiterer Gruppe 5-Hydrogenasen sowie der Sequenzen von Vertretern anderer Hydrogenase-Gruppen verglichen. Hierdurch konnten die Motive für die Bindung von Metallcofaktoren identifiziert werden. Wie bereits durch Constant *et al.*, 2011b, beschrieben, wurden in den großen Untereinheiten der Gruppe 5-Hydrogenasen – und somit auch in der AH – zwei Motive mit je zwei Cysteinen gefunden, die ein [NiFe]-Zentrum ligandieren können. Unter anderem deshalb wurde die AH als [NiFe]-Hydrogenase klassifiziert. In den kleinen Untereinheiten der Gruppe 5-Hydrogenasen wurden konservierte Motive für die Bindung von drei [FeS]-Clustern gefunden. Im Vergleich zu den Motiven in [NiFe]-Hydrogenasen anderer Gruppen sind jedoch die Aminosäuren an einigen Positionen verändert, was eine veränderte Koordination der [FeS]-Cluster erwarten lässt.

Gruppe		
5	<i>R. eutropha</i> HofK	-----MA-----EQAVPYGRKTQHTPALKEVHILWITA
5	<i>S. avermitilis</i> HydA	-----MTAATP---DTVGAADAGGAPADETPTIHLWINA
5	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	-----MPTEAAVKAEQALIHVLWINA
2b	<i>R. eutropha</i> HoxB	-----MNAFVCTGLASAKPGVLNVLWI-Q
1*	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	-----MSLSRRFEVVKLSAGVAGLGISQIYHPGIVHAMTEGAKKAPVIWV-Q
1+O ₂	<i>D. gigas</i> HydA	1-13... ERLERRGVSRDFMFKCTAVAVAMGMGPAFAFKVAEALTA-KKRPVSVYL-H
1+O ₂	<i>R. eutropha</i> HoxK	--MVETFYEVMRQGISRRSFLKYCSLTATSLGLGPSFLPQIAHAMET-KPRTPLVLWL-H
1+O ₂	<i>E. coli</i> HyaA	MNNEETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAATSLGLGAGMAPKIAWALEN-KPRIPIVVWI-H
		:::
		P ↓P
	<i>R. eutropha</i> HofK	GLGCDGDSVSITAASQPSVEDVVLGAIPGLPKVHLHNPVLAYENG-----DEFMAPFHKAARGE
	<i>S. avermitilis</i> HydA	GLSCDGSVALTAAMQPSIEEIVLGVLPGLPKIAVHWPLIDFECGPVGSDFIEWFFKGERGE
	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	GLSCDGSVALTAATQPSIEEIALGALPGLPKIAVHWPLIDFECGPTGGADDFLAWFFRAERGE
	<i>R. eutropha</i> HoxB	SGGCGGCSMSLLCADTDFTGMLKSAGI---HMLWHPSLSLES-----GVEQLQILEDCLOQR
	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	QGGCTGCSVSLNNAVHPRIKEILLDVISL----EFHPTVMASE-----GEMALAHMYEIAEKF
	<i>D. gigas</i> HydA	NAECTGCSSESVLRTVDPYVDELILDLVISM----DYHETLMAGA-----GHAVEEALHE---AI
	<i>R. eutropha</i> HoxK	GLECTCCSESFIRSAHPLAKDVVLSMISL----DYDDTLMAAA-----GHQAEAILLEEIMTKY
	<i>E. coli</i> HyaA	GLECTCOTESFIRSAHPLAKDVILSLISL----DYDDTLMAAA-----GTQAEVFEEDITQY
		* : . : : : . :
		P
	<i>R. eutropha</i> HofK	IDNFVLVLEGSIPNERINGEGYWAAMGTD---PQTHQPITIPWELDRAPKALAVVGAGTCATY
	<i>S. avermitilis</i> HydA	IDPFVLVVEGSIPNESIKPEGYWCFGDN---PETGQPITTSWIDRLAPKALAVVAIGTCATY
	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	LDPFVLVVEGSIPNEEIKNEGYWCFGND---PATGQPITTSWIDRLTPKATAVVAVGTCATY
	<i>R. eutropha</i> HoxB	VALHALCVEGAMLRGPHG-TGRFHL-----AGTGVPMEIWSRLAAVADYTLAVGTCAAY
	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	NGNFFLLVEGAIPT---AKEGRYCIIVGETLDAKHHHEVTMMELIRDLAPKSLATVAVGTCSAY
	<i>D. gigas</i> HydA	KGDFVCVIEGGIPM---GDGGYWGKVGGR-----NMYDICAIVAPKAKAVIAIGTCATY
	<i>R. eutropha</i> HoxK	KGNYILAVEGNPPL---NQDGMSCIIGGR-----PFIEQLKYVAKDAKAIISWGSCASW
	<i>E. coli</i> HyaA	NGKYILAVEGNPPL---GEQGMFCISSGR-----PFIEKLKRAAGASAI IAWGTCASW
		. : ** * : : : : . * : : :
		↓ P
	<i>R. eutropha</i> HofK	GGIHAMEGNPTGCMGLA-----DYLGWQWKSRAGLPIVNVPGCPVQPDNFMETLLYLLYQLA
	<i>S. avermitilis</i> HydA	GGIHAMAGNPTGAMGVP-----DYLGDWKSQAGIPIVCVPGCPPIQPDNFSETLTLYLLYQAA
	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	GGIHAMAGNPTGAMGVP-----DYLGDWKSQAGIPIVCVPGCPPIHDPNLAETLTLYLLYMAT
	<i>R. eutropha</i> HoxB	GGITAGGNPTDACGLQYEGDQPGGLLGLNYSRAGLPVINVAGCPPTHGQWVTDALALLSARLL
	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	GGIPAAEGNVTGSKSVR-----DFFAD---EKIEKLLVNVPGCPPHPDWMVGTLVAAWSHVL
	<i>D. gigas</i> HydA	GGVQAAKNPTGTGVVN-----EALGK-----LGVKAINIAGCPPNPMNFVGTVVHLL----
	<i>R. eutropha</i> HoxK	GCVQAAKNPTQATPVH-----KVITD-----KPIIKVPGCPPIAEVMTGVITYML----
	<i>E. coli</i> HyaA	GCVQAAKNPTQATPID-----KVITD-----KPIIKVPGCPPIPDVMSAITYMV----
		* : * * * : : : ** . :
		D D D D
	<i>R. eutropha</i> HofK	--GLAPMIPLDEALRPKWLFTRTVHDGCDRAGSYEQAIFATEYGNP-----NCIVKLGCGWGPVV
	<i>S. avermitilis</i> HydA	--GAAPMIPLDDKLRTWLFQATVHEGCDRAGYEQGFALTYDSP-----KCLVKLGCGWGPVV
	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	--DQAPMIPLDDALRPKWLFGQSVHEGCDRAGYEQGDFATEYGNP-----KCIVKLGCGWGPVV
	<i>R. eutropha</i> HoxB	-----TASDLDTLGRPRFYADQLVHHGCTRNEYEFKASAEPKPSD-----LGCMMENMGCKGTQA
	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	NPTEHPLPELDDGRPLLFQDNHNCPIYLDKYDNSEFAETFTKP-----GCKAELGCKGPST
	<i>D. gigas</i> HydA	---TKGMPKLDKQGRPMVFGEFTVHDNCPRLKHFEAGEFATSFSGPEAKKGYCLYELGCKGPST
	<i>R. eutropha</i> HoxK	--TFDRIPELDRQGRPKMFYSQRIHDKCYRRPHFDAGQFVEEWDDESARKGFCLYKMGCKGPST
	<i>E. coli</i> HyaA	--TFDRLPDVRMGRPLMFYQRIHDKCYRRPHFDAGQFVEEWDDESARKGFCLYKMGCKGPST
		: * ** : * . : . : : : ** * .
		M M M M
	<i>R. eutropha</i> HofK	QCNVPKRGWIAGVGCPNVGGICIGCTMPGFPDKFMP ...300-351
	<i>S. avermitilis</i> HydA	KCNVPKRGWMNIGGCPNVGGICIACTMPGFPDKFMP ...309-362
	<i>M. smegmatis</i> MSMEG2720	KCNVPKRGWINGIGGCPNVGGICIGCTMPGFPDKFMP ...298-351
	<i>R. eutropha</i> HoxB	HADCNTRLWN-GECSCTRGGYACISCTEPGFEEPGHP ...219-277
	<i>D. baculatum</i> NiFeSe	YADCAKRRWNNGINWVEN-AVCIGCVEPDFPDGKSPFYVAE---315
	<i>D. gigas</i> HydA	YNNCPKQLFN-QVNWVQAGHPICACSEPNFWDLYSPFYSA---264
	<i>R. eutropha</i> HoxK	YNACSTTRWNEGTSFPIQSGHGCIGCSEDGFWDKGSF ...307-360
	<i>E. coli</i> HyaA	YNACSTRWNDGVSFPIQSGHGCIGCAENGFWDRGSF ...309-372
		. : . * : *

Abbildung 3-25: Aminosäuresequenzvergleich der kleinen Untereinheiten ausgewählter [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppen 1 (*R. eutropha* HoxK, *E. coli* HyaA, *D. gigas* HydA, *D. baculatum* [NiFeSe]-Hydrogenase), 2 (*R. eutropha* HoxB) und 5 (*R. eutropha* HofK, *S. avermitilis* HydA, *M. smegmatis* MSMEG2720). In die Koordination von [FeS]-Clustern involvierte Aminosäuren sind grau unterlegt; die für Gruppe 5-Hydrogenasen typischen Positionen sind schwarz hinterlegt. Die Buchstaben P, M und D über den Sequenzen markieren die Liganden des proximalen, medialen und distalen [FeS]-Clusters. Die Aminosäuren des Signalpeptides für den Twin-Arginin-Transportweg (Tat) sind in

grauer Schrift dargestellt; die zusätzlichen Cysteine sauerstofftoleranter Gruppe 1-Hydrogenasen sind durch fette Schrift und einen Pfeil oberhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Gruppe 1* bezeichnet die [NiFeSe]-Hydrogenasen, die gemäß der Klassifizierung von Vignais & Billoud, 2007, der Gruppe 1 der [NiFe]-Hydrogenasen zugerechnet werden.

So ist der [FeS]-Cluster proximal zum [NiFe]-Zentrum üblicherweise durch vier Cysteine koordiniert (Volbeda *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 2013); in sauerstofftoleranten Hydrogenasen der Gruppe 1 treten zwei zusätzliche koordinierende Cysteine auf (Goris *et al.*, 2011; Fritsch *et al.*, 2011b). In Gruppe 5-Hydrogenasen sind keine zusätzlichen Cysteine vorhanden, und ein Aspartat wird anstelle eines koordinierenden Cysteins gefunden (Abbildung 3-25). Da bekannt ist, dass [FeS]-Cluster auch durch Aspartatreste koordiniert werden können (Calzolari *et al.*, 1995; Gruner *et al.*, 2011), ist an der proximalen Position ein durch drei Cysteine und ein Aspartat koordinierter [4Fe4S]-Cluster zu erwarten. In der medialen Position werden in Gruppe 1-Hydrogenasen durch drei Cysteine ligandierter [3Fe4S]-Cluster gefunden (Volbeda *et al.*, 1995). Die Sequenzen von Gruppe 5-Hydrogenasen enthalten wie auch die regulatorischen Hydrogenasen (Gruppe 2b) oder die [NiFeSe]-Hydrogenasen ein viertes Cystein, wodurch vermutlich ebenfalls ein [4Fe4S]-Cluster koordiniert wird. Die Koordination des distalen [FeS]-Clusters durch drei Cysteine und ein Histidin ist in Gruppe 5-Hydrogenasen genau wie in den Hydrogenasen anderer Gruppen konserviert (Abbildung 3-25). Die Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit der AH, HofK, legt somit nahe, dass es sich bei den [FeS]-Clustern jeweils um [4Fe4S]-Cluster handeln könnte.

3.4.4 Die AH enthält die Metalle Nickel und Eisen

Um erste experimentelle Hinweise zu den in der AH vorliegenden Metallcofaktoren zu erhalten wurde der Gehalt verschiedener Metalle in der AH bestimmt. Die Bestimmungen wurden an durch Gelpermeationsschromatographie gereinigten Proben mittels optischer Atomemissionsspektroskopie mit Anregung durch induktiv gekoppeltes Plasma (ICP-OES) durchgeführt; sie fanden an der Universität Potsdam im Laboratorium von Frau Prof. Leimkühler statt.

Die Messungen ergaben einen Gehalt von $1,2 \pm 0,4$ Nickelatomen und $9,0 \pm 4,0$ Eisenatomen pro AH-Molekül. Signifikante Mengen an Kupfer und Zink wurden nicht detektiert. Die ermittelte Anzahl von Nickelatomen in einem AH-Molekül unterstreicht die Annahme, dass das aktive Zentrum der H_2 -Oxidation ein [NiFe]-Zentrum ist. Die theoretische Menge von 13 Eisenatomen pro AH-Molekül (bei 3 [4Fe4S]-Zentren) kann durch die ermittelte Anzahl von Fe-Atomen weder bestätigt noch widerlegt werden, da die Messungen mit einem großen Fehler behaftet sind. Detailliertere Informationen über die Beschaffenheit der Metallcofaktoren der AH wurden durch Röntgenstrukturanalyse an AH-Kristallen (siehe Kapitel 3.5) sowie IR-spektroskopische Untersuchungen (Kapitel 3.7.2) gewonnen.

3.5 Aufklärung der atomaren Struktur der AH durch Kristallstrukturanalyse

Um detaillierte Aussagen über den strukturellen Aufbau der AH und ihrer Metallcofaktoren zu ermöglichen wurde die atomare Struktur der AH mittels Kristallstrukturanalyse bestimmt. Dieses Verfahren ist die zur Zeit leistungsfähigste Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen in atomarer Auflösung, setzt aber das Vorhandensein geeigneter Proteinkristalle voraus.

Daher wurden zunächst Experimente zur Kristallisation der AH durchgeführt, um für die Strukturanalyse geeignete Kristalle zu erhalten. Von geeigneten Kristallen wurden Datensätze aus winkelabhängigen Röntgenbeugungsmustern aufgenommen, aus denen eine Elektronendichtekarte berechnet wurde. Mit Hilfe dieser Elektronendichtekarte wurde eine vorläufige atomare Struktur der AH ermittelt. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Sandra Hennig, Dr. Jae-Hun Jeoung und Dr. Martin Bommer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Dobbek, HU Berlin, durchgeführt; die Datensätze zur Strukturaufklärung wurden am BESSY-Synchrotron, Berlin aufgenommen.

3.5.1 Die AH lässt sich unter verschiedenen Bedingungen kristallisieren und bildet dabei bevorzugt nadelartige Kristalle

Für die Kristallisation der AH wurde eine Vielzahl von Bedingungen auf Kristallwachstum der AH untersucht. Dabei wurden sowohl kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens als auch individuell geplante Screens eingesetzt. Letztere wurden vor allem dann eingesetzt, wenn eine Bedingung eines kommerziellen Screens Kristallwachstum der AH zeigte, und diese Bedingung durch kleine Änderungen der Zusammensetzung für bessere Kristalle der AH optimiert werden sollte. Die Kristallisationsexperimente wurden sowohl aerob als auch anaerob unter Formiergasatmosphäre (5 % H_2 in N_2) durchgeführt. Für die Kristallisationsexperimente wurde aus den Stämmen HF1035 oder HF1038 zur Homogenität gereinigtes Enzym eingesetzt. Ein Teil des eingesetzten Proteins wurde zur Entfernung von Nukleinsäuren in Anwesenheit von RNase isoliert (siehe Kapitel 3.3.4). Ein signifikanter Unterschied im Kristallisationsverhalten konnte zwischen den beiden Präparationsmethoden jedoch nicht festgestellt werden.

Verwendbare AH-Kristalle wurden in einer Reihe von Bedingungen gefunden, jedoch war es in der Regel schwer, das gute Kristallwachstum in diesen Bedingungen zu reproduzieren. Eine Bedingung, die zuverlässig Kristalle der AH lieferte, konnte daher nicht gefunden werden. Die erhaltenen Kristalle der AH waren in der Regel nadelförmig, oft waren diese Nadeln zu igelartigen Kristallgebilden verwachsen (Abbildung 3-26). Der entscheidende Faktor für die Verwertbarkeit eines Kristalles zur Strukturaufklärung war die Dicke der Nadel, welche selten ausreichend groß war, um Streuungsmuster mit guten Auflösungen zu erhalten.

Ein hoher Anteil der getesteten Kristalle lieferte Beugungsmuster, allerdings nur selten über 5 Å Auflösung. Zur Strukturaufklärung konnten lediglich zwei Datensätze mit Auflösungen von ca. 3,3 Å bzw. 2,8 Å verwendet werden. Der beste Datensatz wurde für einen Kristall erhalten, der anaerob in 160 mM Imidazolmalat, pH 7,0 und 17,5 % PEG 4000 gewachsen war. Die Strukturaufklärung erfolgte teilweise durch Vergleich („Molecular Replacement“) mit einer bekannten Kristallstruktur einer Hydrogenase ([NiFeSe]-Hydrogenase aus

Desulfomicrobium baculatum; Sequenzidentität 34 %; PDB 1CC1; Garcin *et al.*, 1999). In dieser Arbeit kann nur eine vorläufige, nicht vollständig verfeinerte Kristallstruktur präsentiert werden, in der noch nicht alle Statistiken die bestmöglichen Werte erreichen. Die Statistiken der verwendeten Strukturdaten sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

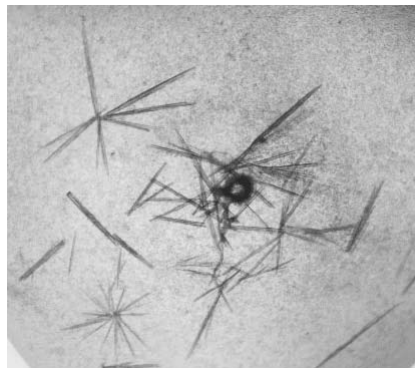


Abbildung 3-26: Kristalle der AH in der am häufigsten beobachteten nadelförmigen Ausprägung, die in mehreren Kristallisationsbedingungen gefunden wurden. Zu erkennen sind auch Büschel, die sich häufig aus mehreren Nadeln bildeten. Die Kristallisation erfolgte unter verschiedenen Bedingungen nach der Sitting-Drop-Methode.

Tabelle 3-1: Statistik der Datenaufnahme und der Verfeinerung durch Molecular Replacement für die in dieser Arbeit verwendete vorläufige Struktur

Parameter	Werte
Datenaufnahme^a	
Raumgruppe	P 1 2 ₁ 1 (Nummer 4)
Auflösung (Å)	45,97 – 2,80
Dimensionen der Einheitszelle	
<i>a</i> / <i>b</i> / <i>c</i> (Å)	81,78 / 267,971 / 144,467
α / β / γ (°)	90,000 / 106,28 / 90,000
Gesamte/ einzigartige Reflexe	625095 / 145425
Multiplizität	4,3 (4,2) ^b
Wilson B-Faktor	44,68
<i>R</i> _{merge}	0,2016 (0,8099)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	16,15 (2,25)
Vollständigkeit (%)	99,56 (95,59)
Verfeinerung	
Moleküle in der Einheitszelle	12 Monomere in 6 Dimeren
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0,1811 / 0,2410
RMS-Abweichungen^c	
Bindungslänge (Å)	0,015
Bindungswinkel (°)	1,56
Ramachandran favorisiert (%)	91
Ramachandran nicht erlaubt (%)	1,3

^a Die Daten wurden an einem Kristall aufgezeichnet.

^b Werte in Klammern bezeichnen die höchstauflösende Schale.

^c *root mean square* (quadratischer Mittelwert)

3.5.2 In der Kristallstruktur liegt die AH als Dimer vor und zeigt alle postulierten Metallzentren und -kofaktoren

Die AH kristallisierte in einer großen Elementarzelle, in der insgesamt sechs Kopien der AH vorliegen. Dabei sind in der vorläufigen Struktur von der kleinen Untereinheit HofK die Reste 6-350 (von 351) aufgelöst; von HofG sind die Reste 19-579 (von 579 nach C-terminaler Prozessierung) zu erkennen. Jede Kopie der AH ist ein Heterodimer aus HofK und HofG. Diese Heterodimere sind jeweils zu Doppeldimeren angeordnet (Abbildung 3-27A). Zur einfacheren Beschreibung wird fortan immer die funktionale Einheit des Enzyms betrachtet, und somit das Heterodimer aus HofK und HofG als Monomer sowie das Doppeldimer als Dimer bezeichnet. Die Monomere der AH sind mit Ausnahme der N- und C-Termini von HofK recht kompakt und globulär aufgebaut. Die Faltung entspricht überwiegend derjenigen anderer [NiFe]-Hydrogenasen (Volbeda *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 2010; Fritsch *et al.*, 2011b; Volbeda *et al.*, 2012), jedoch wurde die C-terminale Domäne der kleinen Untereinheit bislang nur in der membrangebundenen Hydrogenase 1 aus *E. coli* (Volbeda *et al.*, 2013b) und der Kristallstruktur der AH aufgelöst. In der AH ragen beide Termini von HofK deutlich aus der globulären Struktur heraus (Abbildung 3-27B). Etwa 12 Aminosäuren bilden dabei die N-terminale Extension, während die C-terminale Extension etwa 40 Aminosäuren umfasst. Beide Extensionen besitzen α -helicale Bereiche unterschiedlicher Größe. Die membrangebundenen Hydrogenasen besitzen an Stelle der C-terminalen Extension einen Membrananker, der jedoch in Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden kann (Fritsch *et al.*, 2011b; Volbeda *et al.*, 2012). In der Gesamtstruktur ist zu erkennen, dass die terminalen Bereiche das jeweils andere Monomer der AH „umarmen“ (Abbildung 3-27C). Die C-terminalen Bereiche der beiden HofK-Ketten des Dimers bilden α -Helices, die antiparallel direkt nebeneinander verlaufen. Hierdurch wird eine große Kontaktfläche für die Dimerisierung der AH geschaffen. Die gesamte Kontaktfläche zwischen den Monomeren beträgt 5380 \AA^2 , davon entfallen 3067 \AA^2 auf die Kontaktfläche der beiden HofK-Untereinheiten, je 1108 \AA^2 auf die Kontaktflächen von HofK zu HofG des anderen Monomers und lediglich 97 \AA^2 auf die Kontaktfläche der beiden HofG-Untereinheiten. Im Vergleich dazu beträgt die Kontaktfläche zwischen den Monomeren in der Hydrogenase 1 aus *E. coli* maximal etwa 2600 \AA^2 , also etwa die Hälfte der Kontaktfläche der AH (Volbeda *et al.*, 2013b). Die Kontaktfläche der großen und kleinen Untereinheit eines Monomers beträgt in der AH 3037 \AA^2 , was geringer ist als der Wert für die entsprechende Kontaktfläche in sauerstoffempfindlichen bzw. sauerstofftoleranten Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen von ca. 3500 \AA^2 bzw. ca. 3900 \AA^2 (Volbeda *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997; Matias *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2010; Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012).

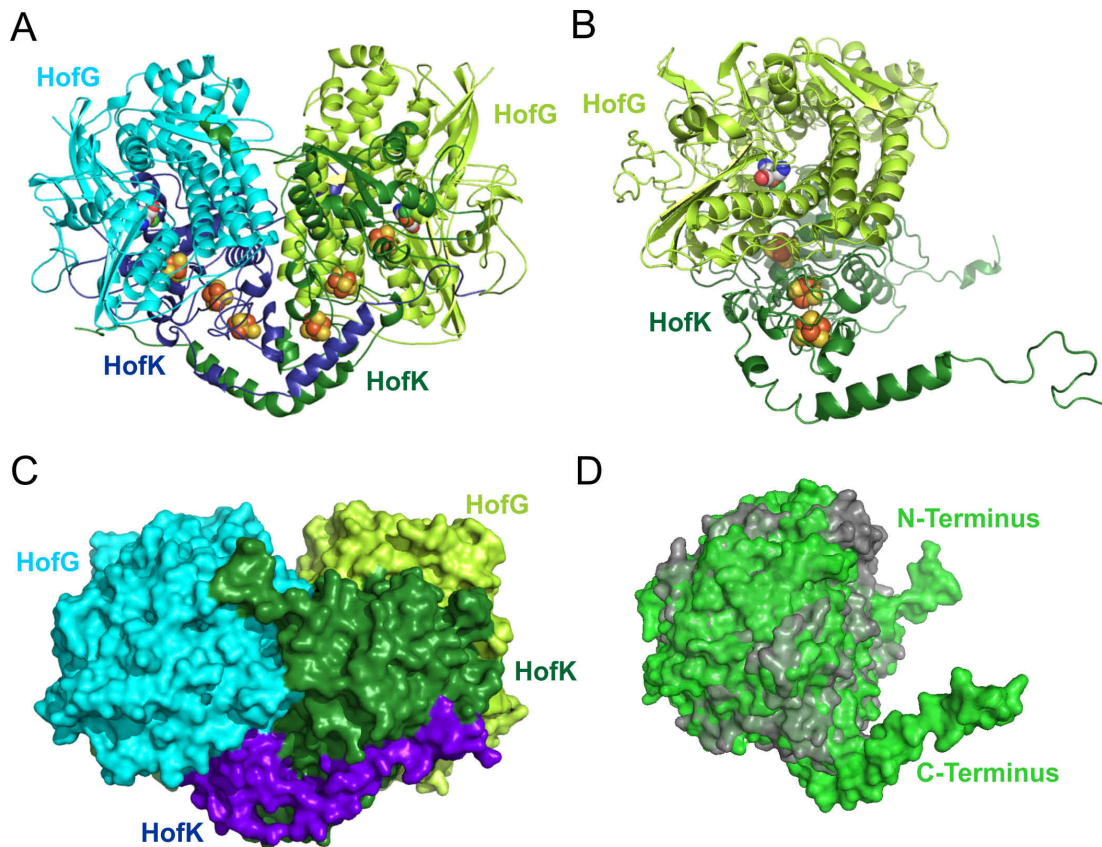


Abbildung 3-27: Gesamtstruktur der AH. (A) Dimer des Monomers aus HofK und HofG. Die beiden Monomere sind in Grün- bzw. Blautönen dargestellt. Die Cofaktoren der AH sind als Sphären im Inneren des Enzyms abgebildet. (B) Monomer aus HofK und HofG mit der Elektronentransportkette und den herausstehenden Termini. (C) Dimer der AH als Oberflächenmodell. (D) Überlagerung des AH-Monomers (grün) mit der Standard-[NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (grau; PDB 1WUL).

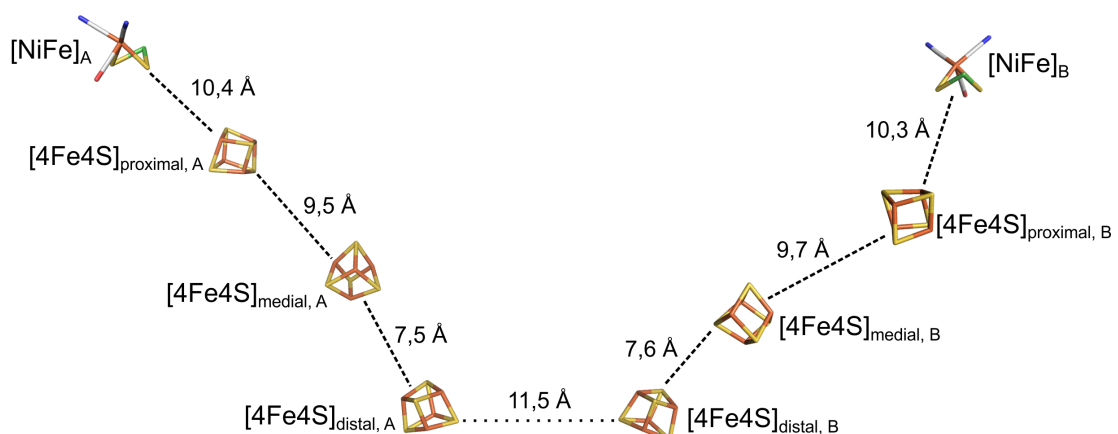


Abbildung 3-28: Elektronentransportketten im AH-Dimer. Die einzelnen Cofaktoren sind als „Sticks“ dargestellt. Die Indizes A bzw. B repräsentieren die Zugehörigkeit zu Monomer A oder B. Die Distanzen bezeichnen die Ecke-zu-Ecke-Abstände der Cofaktoren.

In jeder Kopie der AH wurde ein [NiFe]-Zentrum sowie drei [FeS]-Cluster gefunden, die zu einer Elektronentransportkette angeordnet sind (Abbildung 3-28). Die Elektronentransportketten der Monomere sind dabei so angeordnet, dass sie im Dimer aufeinander zulaufen. Die beiden [NiFe]-Zentren sind in der Struktur weit voneinander entfernt, aber die beiden distalen [FeS]-Cluster liegen nahe beieinander. Die Redoxzentren innerhalb einer Elektronentransportkette sowie die distalen [FeS]-Cluster der beiden Monomere liegen in einer Entfernung zueinander, in der physiologischer Elektronentransport möglich ist (Page *et al.*, 1999). Für die am nächsten beieinander gelegenen Ecken der distalen Cluster wurde ein Abstand von 11-12 Å ermittelt.

3.5.3 Die AH besitzt drei [4Fe4S]-Cluster, wobei der proximale Cluster ein Aspartat als Liganden hat

Das Monomer der AH liegt in der Elementarzelle in sechs Kopien vor. Die einzelnen Monomere in der Elementarzelle weichen laut der vorläufigen Kristallstruktur geringfügig voneinander ab. Daher und aufgrund der relativ geringen Auflösung der Verfeinerungen von 2,8 Å können aus den verfügbaren Daten keine absolut zuverlässigen Aussagen über Konformationen und Geometrien gezogen werden. Jedoch erscheinen die Daten in der erhaltenen Form glaubwürdig und werden daher so dargestellt.

In der AH liegt ein [NiFe]-Zentrum vor, das die typischen Merkmale einer [NiFe]-Hydrogenase aufweist: ein Eisen, das einen Carbonyl- und zwei Cyanidliganden trägt sowie ein durch vier Cysteinliganden koordiniertes Nickel. Zwei der Cysteine sind verbrückende Liganden zwischen dem Ni und dem Fe. Zwischen dem Ni und dem Fe ist zudem eine freie Bindestelle vorhanden, an der vermutlich die Spaltung von H₂ stattfindet (Abbildung 3-29A). Es handelt sich um eine Struktur des reduzierten Zustandes; ein vermutlich hier bindendes Wasserstoffatom kann bei dieser Auflösung freilich nicht detektiert werden. Das Eisenatom liegt höchstwahrscheinlich in einer unter Berücksichtigung der freien Bindestelle oktaedrischen Koordination vor. Das Nickel wird von den vier Cysteinliganden offenbar verzerrt tetraedrisch koordiniert. Die Koordinationssphäre des [NiFe]-Zentrums zeigt leichte Abweichungen im Vergleich zu Hydrogenasen anderer Gruppen (Abbildung 3-29B). So ersetzt in der AH das Prolin 522 das Valin 551 der MBH aus *R. eutropha*; die entgegengesetzte Änderung (Prolin 529_{MBH} zu Valin 500_{AH}) wird an einer anderen Position beobachtet. An der Position des nicht direkt koordinierenden Cysteins 81 der MBH besitzt die AH das Asparagin 87, und die Position des Aspartats 117 in der MBH wird in der AH von dem Isoleucin 83 besetzt. Ob diese Veränderungen Auswirkungen auf die Funktionalität der AH haben ist jedoch derzeit unbekannt.

Für die RH aus *R. eutropha* wurde gefunden, dass im Gaskanal, der zum aktiven Zentrum führt, die voluminösen Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin sitzen, deren Austausch gegen kleine Aminosäuren zu einer sauerstoffempfindlichen Variante der RH führte (Buhrke *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass diese Aminosäuren den Zugang von Sauerstoff zum aktiven Zentrum verhindern. Bei der MBH werden diese Positionen von den kleineren Aminosäuren Leucin und Valin eingenommen; in der AH tritt mit Leucin und Isoleucin eine gemischte Form auf. Diese Konfiguration führt gemäß der Struktur der AH aber nicht zu einer Verengung des Gaskanals. Jedoch zeigt die Struktur der AH einen deutlich engeren mutmaßlichen Gaskanal als beispielsweise die MBH, zudem wird ein anderer Verlauf als in der MBH beobachtet (Abbildung 3-30). Somit ist nicht auszuschließen, dass es an einer

anderen Stelle des Gaskanals der AH eine Engstelle gibt, die den Zugang von O_2 zum aktiven Zentrum verhindert.

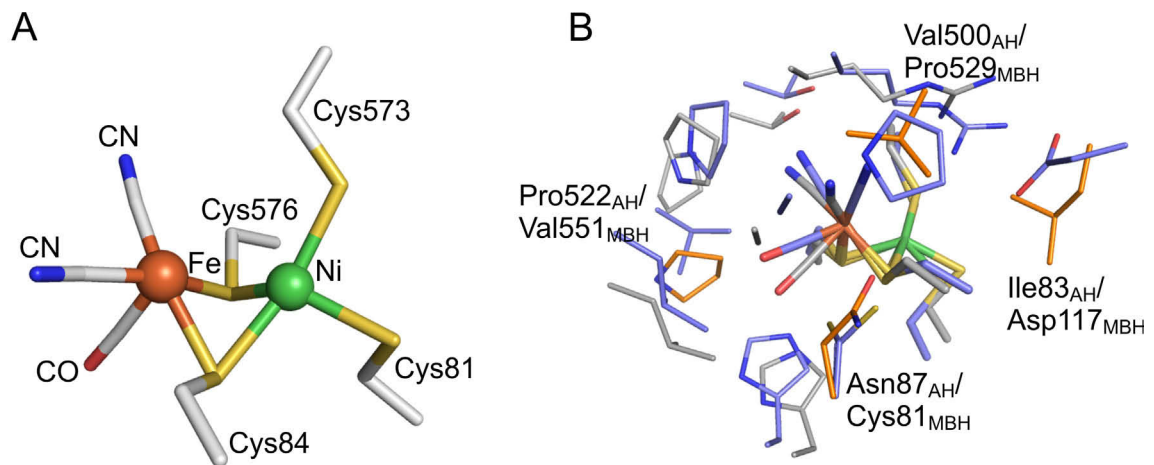


Abbildung 3-29: Struktur des [NiFe]-Zentrums der AH. A) [NiFe]-Zentrum der AH mit koordinierenden Cysteinresten. Die Metallatome sind als Sphären, die übrige Struktur als „Sticks“ dargestellt. Das vermutlich in der Bindestelle vorhandene H-Atom kann in der Elektronendichte nicht aufgelöst werden. Die Anordnung der CO- und CN-Liganden wurde gemäß Rippers *et al.*, 2012, vorgenommen. B) Die Koordinationssphäre des [NiFe]-Zentrums der AH (weiß), überlagert mit den entsprechenden Resten der MBH aus *R. eutropha* (PDB 3RGW; blau). Die abweichenden Positionen der AH sind in orange dargestellt und beschriftet.

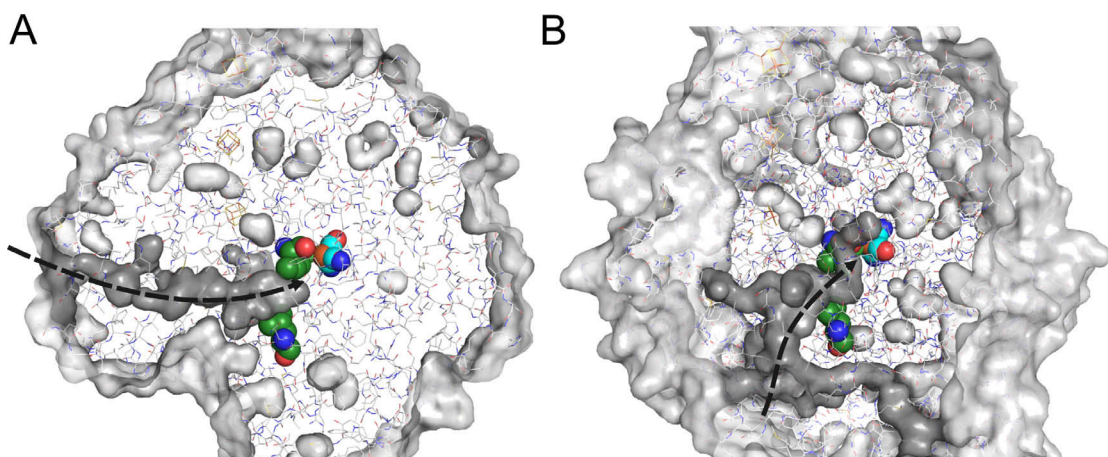


Abbildung 3-30: Mutmaßliche Gaskanäle der AH (A) und der MBH (B; PDB 3RGW) aus *R. eutropha* als Oberflächenmodell. Die Enzyme sind in identischer Orientierung gezeigt. Das [NiFe]-Zentrum ist jeweils als blaue Sphären dargestellt, die Aminosäuren, die in der RH als „Gate“ für O_2 angenommen werden, sind durch grüne Sphären repräsentiert. Der anzunehmende Verlauf der Gaskanäle der zwei Hydrogenasen ist durch gestrichelte Pfeile verdeutlicht.

Die drei in HofK vorliegenden [FeS]-Cluster sind wie vorhergesagt (Kapitel 3.4.3) jeweils [4Fe4S]-Cluster mitsamt der angenommenen Ligandierung. Interessant ist die Konfiguration der Liganden am proximalen [4Fe4S]-Cluster. Neben drei Cysteinen tritt hier ein Aspartat als Ligand auf. Je nach betrachtetem Monomer der AH ist das Aspartat offenbar leicht unterschiedlich angeordnet. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Entfernungen der beiden Sauerstoffatome des Aspartats zum Eisen. Für das eine Sauerstoffatom werden Abstände von 2,0-2,1 Å zum Eisen bestimmt, das andere Sauerstoffatom zeigt Abstände von 2,2-3,6 Å. Somit können eines oder beide Sauerstoffatome in Bindungsreichweite zum Eisen des Clusters liegen, und es ist offenbar sowohl einzähnige als auch zweizähnige Ligandierung des Eisens möglich (Abbildung 3-31). Die Struktur einer F_{420} -reduzierenden Hydrogenase aus *Methanothermobacter marburgensis* zeigt ebenfalls einen durch drei Cysteine und ein Aspartat koordinierten [4Fe4S]-Cluster, jedoch ließen sich aufgrund der Auflösung von ca. 5 Å keine detaillierten Aussagen zur Koordination des Clusters ableiten (Mills *et al.*, 2013). Der mediale Cluster der AH ist wie bei den regulatorischen Hydrogenasen ein regulärer [4Fe4S]-Cluster, der durch vier Cysteine koordiniert wird. Der distale [4Fe4S]-Cluster ist wie auch in Gruppe 1- und Gruppe 2b-Hydrogenasen durch drei Cysteine und ein Histidin ligandiert (Abbildung 3-32).

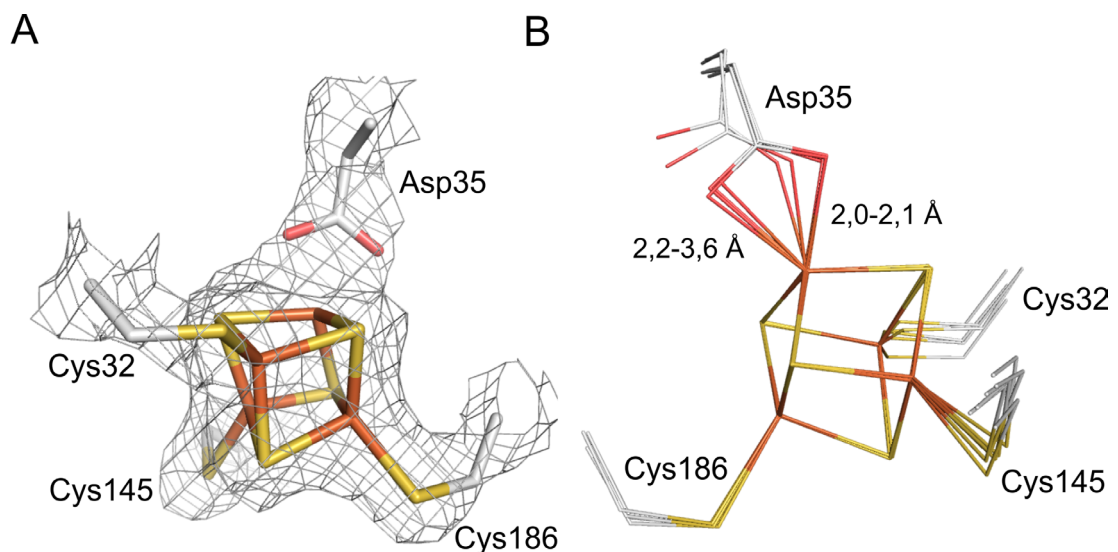


Abbildung 3-31: Der proximale [4Fe4S]-Cluster der AH. A) Darstellung des proximalen Clusters mit vermutlich zweizähnig bindendem Aspartat und der Elektronendichte des Clusters bei 2,8 Å. Der Cluster und seine Liganden sind als „Sticks“ dargestellt, die Elektronendichte durch ein graues Netz (dargestellt ist die $2F_0-F_c$ -Elektronendichte bei 2,8 Å mit dem Konturierungslevel $2,0 \sigma$). B) Überlagerung der Strukturen der proximalen Cluster der einzelnen Monomere einer Einheitszelle. Die Distanzen der beiden für eine Bindung an den Cluster in Frage kommenden Sauerstoffatome des Aspartats sind angegeben. Eine Bindung zum Fe wurde bis zu einem Abstand von 2,3 Å dargestellt.

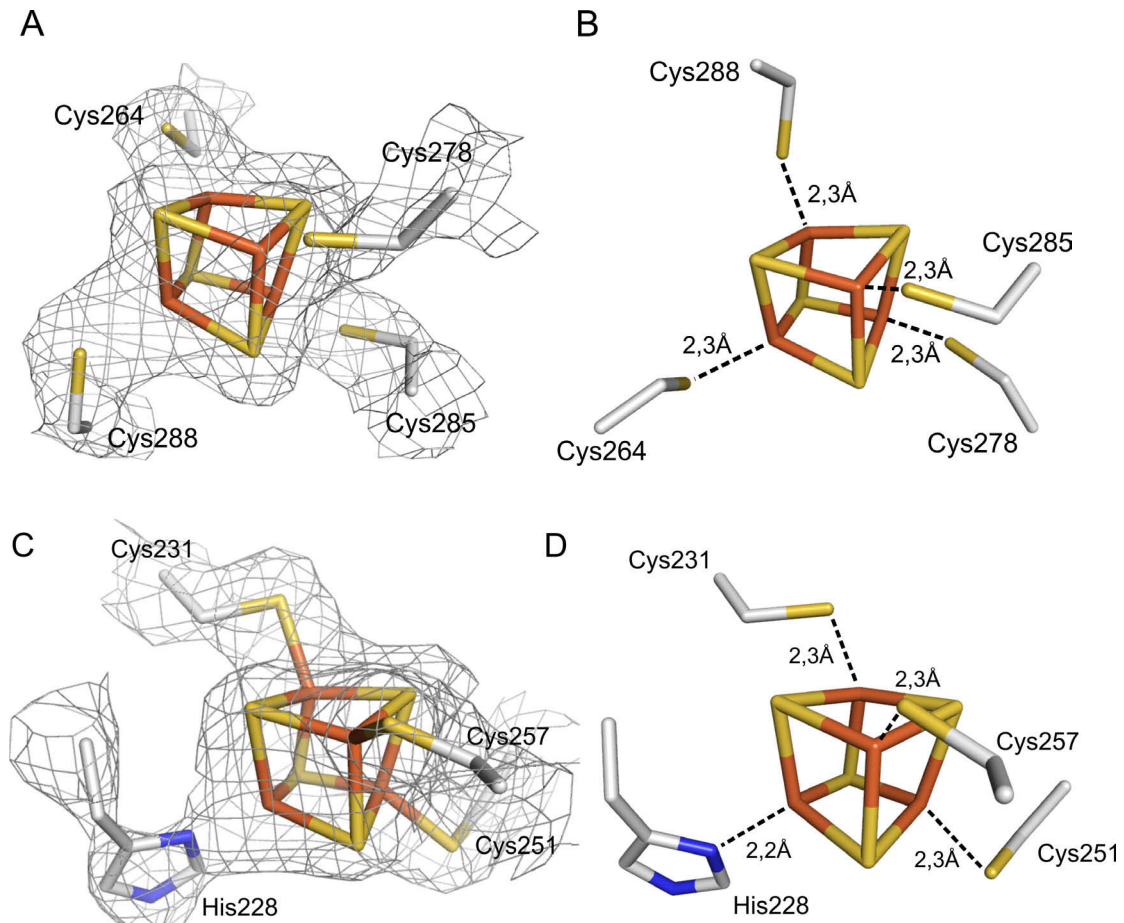


Abbildung 3-32: Medialer und distaler [4Fe4S]-Cluster der Elektronentransportkette der AH. A+B) Medialer [4Fe4S]-Cluster. Dieser Cluster wird durch vier Cysteine koordiniert. C+D) Distaler [4Fe4S]-Cluster. Die Koordination erfolgt durch drei Cysteine und ein Histidin. Die linken Teilabbildungen (A+C) zeigen die Cluster mit der gefundenen Elektronendichte als graues Netz (dargestellt ist die $2F_0-F_c$ -Elektronendichte bei 2,8 Å mit dem Konturierungslevel 2,0 σ). Die rechten Teilabbildungen (B+D) zeigen die Abstände jedes Liganden zu dem durch diesen koordinierten Fe-Atom im Cluster. Die [FeS]-Cluster sind als „Sticks“ dargestellt.

3.6 Katalytische Parameter für den Umsatz von Wasserstoff durch die AH

Neben der Aufklärung des Aufbaus und der Struktur der AH war die Bestimmung der grundlegenden katalytischen Eigenschaften der AH ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit. Hierzu wurden die katalytischen Aktivitäten der AH mit gereinigtem Enzym unter einer Vielzahl unterschiedlicher Bedingungen und mit verschiedenen Methoden untersucht.

3.6.1 Etablierung eines photometrischen Assays für die Bestimmung der AH-Aktivität

Um die Aktivität der AH in Zellextrakten und am gereinigten Enzym quantifizieren zu können, wurde ein spektrophotometrischer Aktivitätstest etabliert, bei dem die durch die AH vermittelte wasserstoffabhängige Reduktion eines Elektronenakzeptors verfolgt wird. Diese Methode wird zur Bestimmung der Aktivitäten von Hydrogenasen aus *R. eutropha* seit langer Zeit eingesetzt (Schneider & Schlegel, 1976; Schink & Schlegel, 1979).

3.6.1.1 Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) wurde als am besten geeigneter Elektronenakzeptor für die Messung von H₂-Oxidationsaktivitäten der AH identifiziert

Das zentrale Problem bei der Etablierung eines photometrischen Aktivitätsassays für die AH war das Auffinden eines geeigneten Elektronenakzeptors. In Frage kommende Akzeptoren müssen ein geeignetes Redoxpotential sowie eine geeignete Struktur aufweisen, um die Übertragung von Elektronen von der AH zu ermöglichen. Des Weiteren ist es notwendig, dass die Akzeptoren im UV/Vis-Bereich im oxidierten und reduzierten Zustand unterschiedliche Spektren aufweisen. Somit kann die Änderung des Redoxzustandes des Akzeptors bei einer bestimmten Wellenlänge verfolgt werden. Hierfür ist es überdies wünschenswert, dass mit der Änderung des Redoxzustandes bei der betrachteten Wellenlänge eine große Änderung des Extinktionskoeffizienten einhergeht, sodass die Aktivität des Enzyms präzise bestimmt werden kann.

Daher wurde eine große Anzahl natürlicher und artifizieller Elektronenakzeptoren auf ihre Eignung in einem photometrischen Aktivitätsassay für die AH getestet. Die natürlichen Akzeptoren umfassten NAD⁺, NADP⁺, FMN und FAD, verschiedene Cytochrom c-Varianten (aus Rind bzw. Pferd, sowie Cytochrom c6 aus *Synechocystis* PCC6803), Ferredoxin aus Spinat sowie verschiedene Chinonderivate, insbesondere Ubichinon Q₀, Durochinon und Menadion. Zu den getesteten artifiziellen Akzeptoren zählten Methylenblau, Phenazinmethosulfat (PMS), Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), Methyl- und Benzylviologen, sowie Ferricyanid. Zunächst wurden die Tests mit löslichen Zellextrakten von *R. eutropha* HF864 (P_{MBH}-AH) durchgeführt, jedoch traten hier mit zahlreichen Akzeptoren wasserstoffabhängige oder -unabhängige Nebenreaktionen auf, welche die Quantifizierung einer möglichen Aktivität der AH im ungereinigten Zustand unmöglich machten. Diese Nebenreaktionen traten auch mit den Akzeptoren PMS und NBT auf, mit denen die Aktivität der AH durch Aktivitätsfärbung in nativen Gelen nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.2). In den in Abbildung 3-2 gezeigten CN-PAGE-Gelen sind diese Nebenreaktionen in Form einer zusätzlich auftretenden Bande sichtbar. Die akzeptorspezifischen Aktivitäten der AH ließen sich allerdings mit gereinigtem Enzym ermitteln. Die höchste Aktivität der AH wurde dabei mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der AH mit den getesteten Akzeptoren sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Für die Reaktion der gereinigten AH mit NBT wurde eine spezifische Aktivität von 0,28±0,02 U/mg ermittelt, welche geringfügig höher lag als die für andere Akzeptoren bestimmten Aktivitäten. Anfänglich wurde für NBT eine deutlich höhere spezifische Aktivität von 0,78±0,04 U/mg gemessen; diese Aktivität konnte allerdings später aus unbekannten Gründen nicht mehr erreicht werden. In dieser Arbeit werden daher nur die Daten präsentiert, die mit den späteren, weniger aktiven Präparationen der AH ermittelt wurden. Mit Ausnahme der spezifischen Aktivität wurden mit frühen und späteren Präparationen aber jeweils übereinstimmende Ergebnisse erhalten.

Tabelle 3-2: Spezifische H₂-Oxidationsaktivitäten der AH mit verschiedenen Elektronenakzeptoren

Akzeptor	Wellenlänge [nm]	Spezifische Aktivität [U/mg]
NAD ⁺	365	0,00
FAD	450	0,09±0,03
FMN	450	0,07±0,02
Durochinon	255	0,08±0,01
Ferricyanid	405	0,12±0,03
Menadion	360	0,13±0,02
Methylenblau	570	0,17±0,04
PMS	388	0,18±0,03
Methylviologen	578	0,23±0,03
NBT	593	0,28±0,02

Die H₂-Oxidationsaktivität der AH wurde spektrophotometrisch bei den für die Elektronenakzeptoren jeweils geeigneten Wellenlängen bestimmt. Die Bestimmung wurde in H₂-gesättigtem Messpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8) mit je nach Substanz 50 µM bis 1 mM Elektronenakzeptor durchgeführt.

3.6.1.2 Bestimmung der Parameter für die Verwendung von NBT als Akzeptor in einem photometrischen Assay

Da in der Literatur höchst unterschiedliche Bedingungen für photometrische Messungen mit NBT beschrieben sind (Brown *et al.*, 1996; Niraula *et al.*, 2010; Schreiner & Eikmanns, 2005), wurden die relevanten Parameter erneut bestimmt und gemäß der eigenen Bestimmung für nachfolgende Untersuchungen verwendet. NBT zeigt bei der Reduktion einen breiten Bereich zwischen ca. 530 nm und ca. 600 nm, in dem sich die Absorption ändert (Abbildung 3-33). Anhand von Differenzspektren wurde hierbei bei 593 nm die größte Absorptionsänderung gefunden. Für diese Wellenlänge wurden die Extinktionskoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

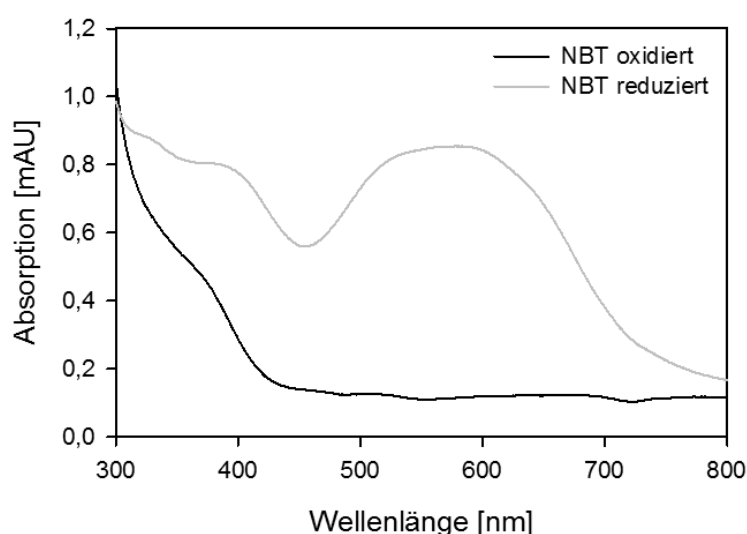


Abbildung 3-33: UV/Vis-Spektren von NBT im oxidierten (schwarze Linie) und reduzierten Zustand (graue Linie). Die Absorption zwischen 300 nm und 800 nm wurde für oxidiertes und mit Natriumdithionit reduziertes NBT spektrophotometrisch bestimmt.

Tabelle 3-3: Extinktionskoeffizienten von NBT bei 593 nm und verschiedenen pH-Werten

pH	Extinktionskoeffizient [1/(mM·cm)]
7	16,2
7,5	18,4
8	17,7
8,5	20,1
9	20,1
9,5	20,7
10	18,8

3.6.2 Für die Reaktion der AH mit NBT wurde eine Michaelis-Konstante von 7,8 μM bestimmt

Zur weiteren Charakterisierung der Elektronenübertragungsreaktion zwischen der AH und NBT wurde die Michaelis-Konstante (K_M) für die Reaktion der AH mit NBT (K_M^{NBT}) bestimmt. Hierzu wurden Konzentrationen von 0-300 μM NBT eingesetzt; die Messungen wurden in H_2 -gesättigtem Puffer bei 30 °C durchgeführt. Aus den Messwerten wurden mittels nichtlinearer Regression die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt (Abbildung 3-34). Dabei wurden ein K_M^{NBT} von $7,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Aktivität (V_{max}) von 0,28 U/mg gefunden.

Mit Hilfe des als K_M^{NBT} ermittelten Wertes konnte eine geeignete Konzentration von NBT als Elektronenakzeptor für die photometrische Aktivitätsbestimmung der AH bestimmt werden. Die Konzentration von NBT sollte dabei im Bereich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit liegen. Daher wurden alle weiteren Messungen mit einer Konzentration von 75 μM NBT durchgeführt.

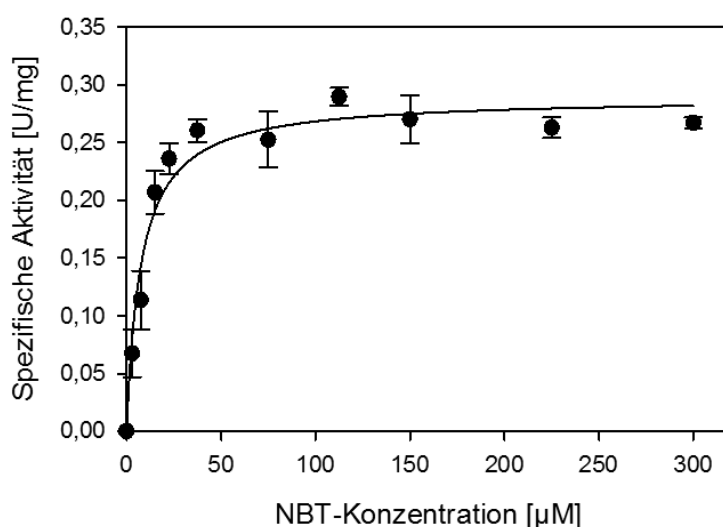


Abbildung 3-34: H_2 -Oxidationsaktivität der AH in Abhängigkeit der NBT-Konzentration. Die H_2 -Oxidationsaktivität gereinigter AH wurde bei verschiedenen NBT-Konzentrationen bestimmt. Aus den Messwerten wurden die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung mittels nichtlinearer Regression ermittelt.

3.6.3 Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_M) für die Reaktion der AH mit H_2 *in-vivo* und am gereinigten Enzym

3.6.3.1 Das gereinigte Enzym zeigt einen K_M -Wert für H_2 von 3,6 μM

Die Michaelis-Konstante der isolierten AH wurde auch für die Reaktion mit H_2 bestimmt. Für eine Reihe von *Streptomyces*-Stämmen, in denen eine Gruppe 5-Hydrogenase codiert ist, wurde ein sehr geringer K_M für die Wasserstoffaufnahme bestimmt, der es den betreffenden Stämmen ermöglicht, Wasserstoff in atmosphärischen Konzentrationen (0,5 ppm) zu nutzen (Constant *et al.*, 2008, Constant *et al.*, 2010). Diese extrem hohe Affinität wurde als charakteristisches Merkmal von Gruppe 5-Hydrogenasen angenommen (Constant *et al.*, 2011b).

Für die MBH aus *R. eutropha* wurde eine Abnahme des K_M -Wertes mit sinkender Temperatur festgestellt (Cracknell *et al.*, 2009). Da *R. eutropha* aus Erdboden bzw. Schlamm gewonnen wurde (Wilde, 1962), dessen Durchschnittstemperatur vermutlich deutlich unter 30 °C liegt, wurde der K_M -Wert für die H_2 -Oxidation der AH außer bei 30 °C auch bei 15 °C bestimmt. Für die Messungen wurde bei einer konstanten NBT-Konzentration von 75 μM die Wasserstoffkonzentration im Reaktionsansatz variiert. Es wurden H_2 - und N_2 -gesättigte Puffer in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen eingesetzt. Aus den bei 30 °C ermittelten Werten wurde ein $K_M^{H_2}$ von $3,6 \pm 0,5 \mu M$ ermittelt (Abbildung 3-35A). Bei 15 °C wurde ein gegenüber der Bestimmung bei 30 °C leicht erhöhter K_M -Wert von $4,9 \pm 1,2 \mu M$ ermittelt (Abbildung 3-35B). Somit ist die AH höchstwahrscheinlich nicht in der Lage, Wasserstoff in atmosphärischen Konzentrationen zu oxidieren. Dies ist konsistent mit der früheren Beobachtung, dass *R. eutropha*-Kulturen nicht in der Lage sind, H_2 in atmosphärischen Konzentrationen aufzunehmen (Conrad *et al.*, 1983).

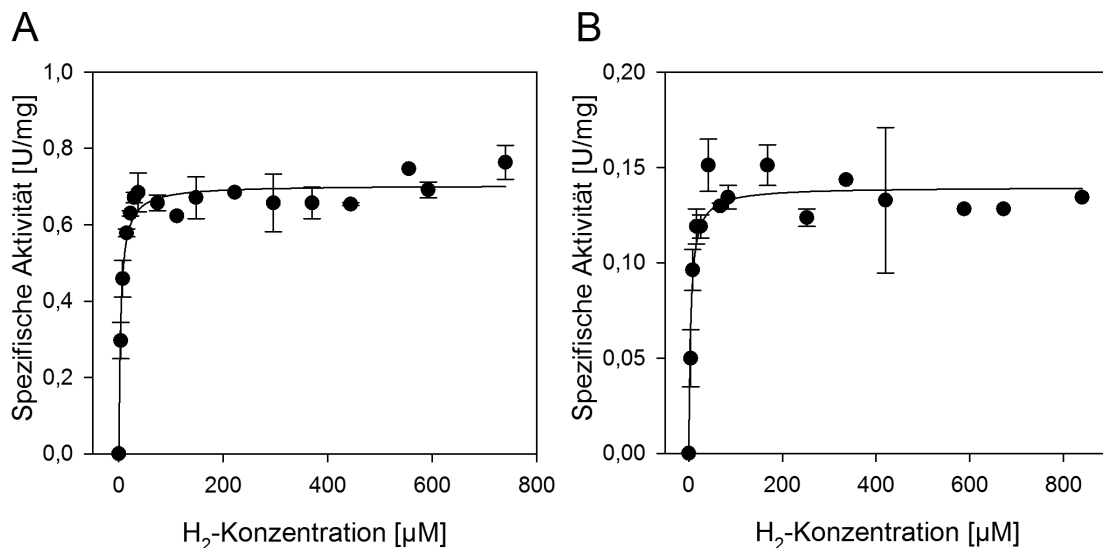


Abbildung 3-35: H_2 -Oxidationsaktivität der AH in Abhängigkeit von der Wasserstoffkonzentration. A) Bestimmung bei 30 °C. B) Bestimmung bei 15 °C. Die H_2 -Oxidationsaktivität gereinigter AH wurde bei verschiedenen H_2 -Konzentrationen bestimmt. Aus den Messwerten wurden die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung mittels nichtlinearer Regression ermittelt.

3.6.3.2 In lebenden Zellen beträgt der K_M -Wert für die AH-vermittelte H_2 -Aufnahmeaktivität $0,76 \mu M$

Da die Affinitäten der Gruppe 5-Hydrogenasen in *Streptomyces*-Stämmen bislang ausschließlich an lebenden Zellen bestimmt wurden (Constant *et al.*, 2010), und somit nur eingeschränkt mit den am isolierten Enzym gewonnenen Daten für die AH (Kapitel 3.6.3.1) vergleichbar sind, wurde zusätzlich der K_M -Wert für die AH-vermittelte H_2 -Aufnahmeaktivität von *R. eutropha* bestimmt. Hierzu wurden bis zu einer OD_{436} von ca. 10 gewachsene Kulturen der Stämme HF500 (P_{AH} -AH) und HF864 (P_{MBH} -AH) unter eine Atmosphäre aus Luft mit 0-2 % [v/v] H_2 (0-400 μM) gesetzt und der jeweilige H_2 -Verbrauch gaschromatographisch bestimmt.

Die Bestimmung des K_M -Wertes gelang auf Grund erheblicher Schwankungen der ermittelten Aktivitäten nur mit dem Stamm HF864 (P_{MBH} -AH). Daher bleibt auch mit diesem Stamm eine Unsicherheit bei der Bestimmung (Abbildung 3-36). Der hierbei bestimmte Wert von $0,76 \pm 0,26 \mu M H_2$ ist um den Faktor 5 geringer als der K_M für die isolierte AH, unterstreicht aber dennoch die im Kapitel 3.6.3.1 getroffenen Schlussfolgerungen, dass die AH in *R. eutropha* nicht zur Aufnahme von H_2 in atmosphärischen Konzentrationen befähigt ist.

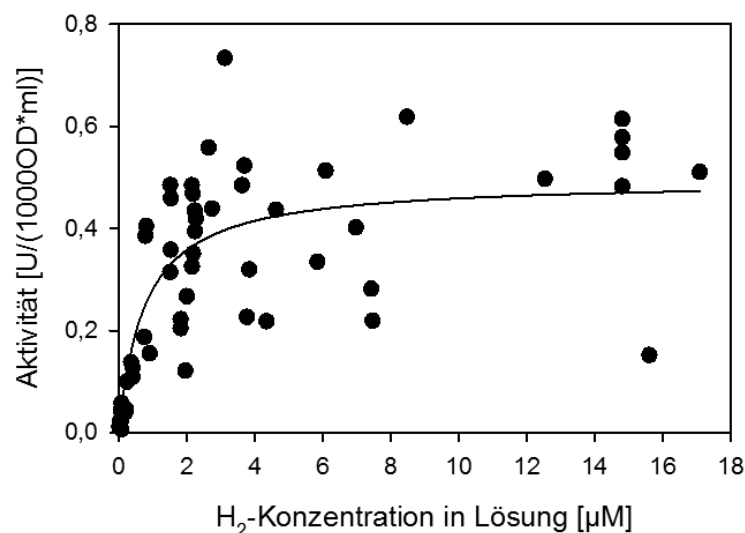


Abbildung 3-36: H_2 -Aufnahmeaktivität lebender Zellen des Stammes HF864 (P_{MBH} -AH) in Abhängigkeit von der H_2 -Konzentration in der Flüssigkultur. Bis zu einer OD_{436} von ca. 10 kultivierte Zellen wurden unter Atmosphären mit verschiedenen H_2 -Konzentrationen gesetzt. Die H_2 -Konzentrationen in den Proben wurden in regelmäßigen Abständen bestimmt. Aus den H_2 -Aufnahmeaktivitäten der einzelnen Proben wurde mittels nichtlinearer Regression die Michaelis-Konstante für die *in-vivo* H_2 -Oxidation ermittelt.

3.6.4 Die AH erreicht ihre maximale katalytische Aktivität bei einer Temperatur von mindestens $80^\circ C$

Als weiterer Teil der biochemischen Charakterisierung der AH wurde die Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur bestimmt. Die H_2 -Aufnahmeaktivität der AH wurde hierfür bei pH 8 und Temperaturen zwischen $15^\circ C$ und $80^\circ C$ gemessen. Dabei wurde ein exponentieller Anstieg der Aktivität mit steigender Temperatur beobachtet (Abbildung 3-37). Die höchste

Aktivität der AH wurde bei 80 °C bestimmt. Messungen oberhalb von 80 °C konnten gerätebedingt nicht durchgeführt werden. Die Aktivität der AH bei 80 °C lag etwa 16-fach höher als bei 30 °C. Die AH erwies sich selbst bei 80 °C als ausreichend stabil, um diese Messungen mit einer durchschnittlichen Messdauer von ca. 3 min durchzuführen (siehe Kap. 3.6.6). Da eine Messtemperatur von 80 °C jedoch keine physiologische Bedingung darstellt, wurde für alle übrigen Messungen eine Temperatur von 30 °C verwendet.

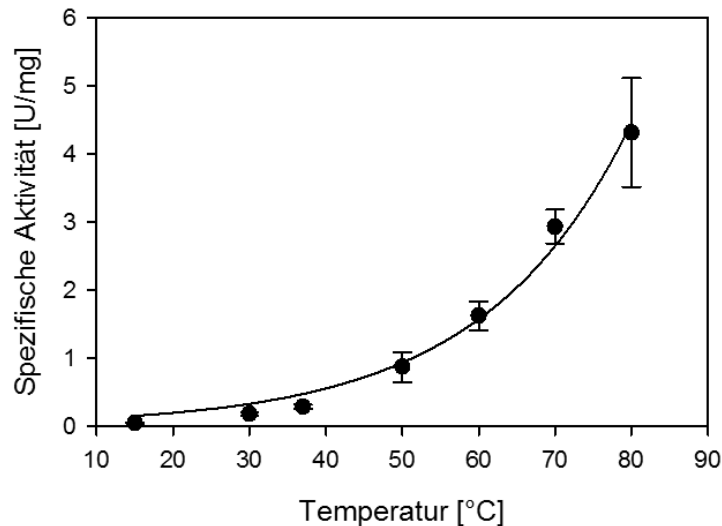


Abbildung 3-37: Temperaturabhängigkeit der H₂-Oxidationsaktivität der AH. Die Aktivität der AH wurde mit gereinigtem Enzym bei Temperaturen von 15-80 °C bestimmt. Die Kurve beschreibt die mittels nichtlinearer Regression ermittelte Exponentialfunktion der Aktivität, $y=0,0694 \cdot e^{0,052 \cdot x}$.

3.6.5 Die AH erreicht mit NBT als Akzeptor die maximale katalytische Aktivität bei pH 11

Die H₂-Aufnahmeaktivität der AH hängt außer von der Temperatur auch entscheidend vom pH-Wert ab. Daher wurden hierzu ebenfalls Messreihen durchgeführt. Die Messungen wurden bei 30 °C mit NBT als Elektronenakzeptor durchgeführt, der pH wurde zwischen 5 und 12 variiert. Da kein Puffersystem zur Verfügung steht, welches für den gesamten betrachteten pH-Bereich über eine ausreichende Pufferkapazität verfügt, wurden unterschiedliche Puffer verwendet. Hierbei wurde für pH-Werte zwischen 5 und 8 KHPO₄/KH₂PO₄-Puffer, zwischen 7 und 9 Tris/HCl-Puffer sowie über pH 9 CAPSO/HCl verwendet.

Eine weitgehend gleichbleibende Aktivität der AH wurde zwischen pH 7 und pH 9 bestimmt. Unter pH 7 zeigte die AH nur geringe Aktivität, während über pH 9 ein starker Anstieg der Aktivität beobachtet wurde (Abbildung 3-38A). Die maximale Aktivität wurde bei pH 11 erreicht. Sie lag etwa zweifach über dem Wert bei pH 8. Oberhalb von pH 11 wurde ein rascher Zerfall des Enzyms beobachtet, wodurch keine Aktivität mehr bestimmt werden konnte. Da ein pH-Optimum bei pH 11 jedoch außerhalb des physiologisch relevanten Bereiches liegt, wurden alle übrigen Bestimmungen bei pH 8 durchgeführt.

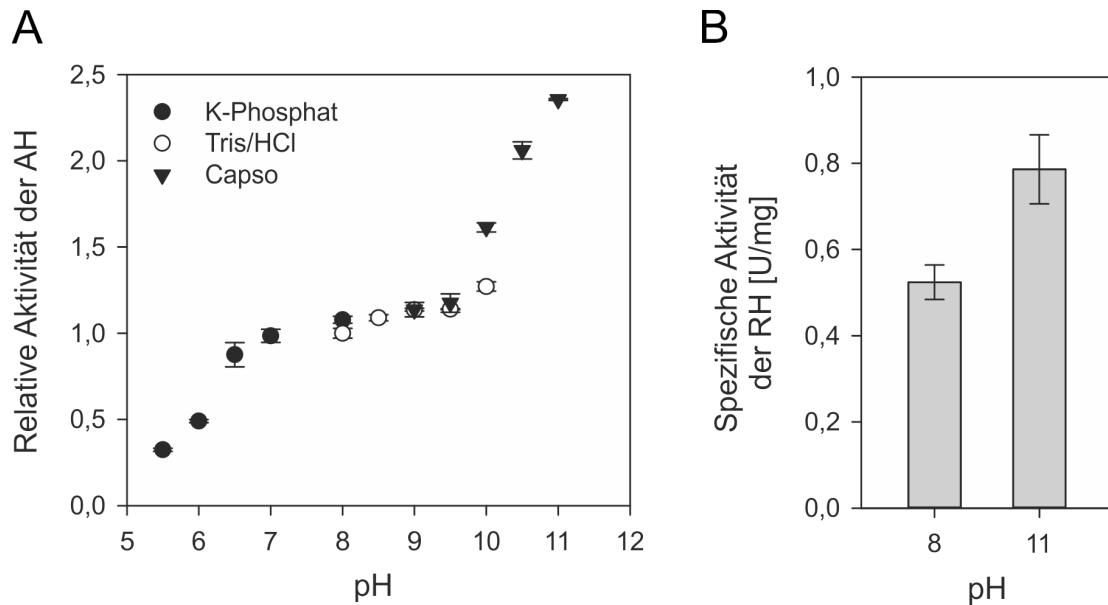


Abbildung 3-38: A) pH-Abhängigkeit der H_2 -Oxidationsaktivität der AH. Die Aktivität der AH wurde mit gereinigtem Enzym bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Folgende Puffer wurden verwendet: 50 mM K-Phosphat (gefüllte Kreise), 50 mM Tris/HCl (offene Kreise), 50 mM CAPSO (3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure, Dreiecke). Alle Aktivitäten wurden auf den Wert in Tris/HCl-Puffer, pH 8 normiert. B) H_2 -Oxidationsaktivität der RH mit NBT bei pH 8 und pH 11.

Zum Vergleich der AH mit dem Verhalten anderer Hydrogenasen wurde die H_2 -Oxidationsaktivität mit NBT auch für die RH bestimmt. Hierbei wurde die Aktivität bei pH 8 und bei pH 11 bestimmt. Auch für die RH zeigte sich eine ca. 1,6-fache Aktivität bei pH 11 gegenüber pH 8, was mit Methylenblau als Elektronenakzeptor nicht gefunden worden war (Bernhard *et al.*, 2001). Das für die AH gefundene Verhalten könnte also zum Teil auch dem Elektronenakzeptor NBT geschuldet sein.

3.6.6 Die AH zeigt hohe Stabilität unter verschiedenen Bedingungen

3.6.6.1 Die AH ist unter sauerstoffhaltigen Atmosphären recht stabil, degradiert aber in Anwesenheit von Wasserstoff

Um die Stabilität der AH unter verschiedenen Atmosphären zu untersuchen, wurde das Enzym über längere Zeit unter Luft, H_2 und O_2 bei 4 °C gelagert und die H_2 -Oxidationsaktivität in regelmäßigen Intervallen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Aktivität der AH sowohl an Luft als auch unter reinem Sauerstoff über die Dauer des Experiments von sieben Tagen nur geringfügig abnahm. Hingegen zeigte die AH unter Wasserstoffatmosphäre eine deutliche Abnahme der Aktivität; nach 7 Tagen wurde nur noch geringe Restaktivität bestimmt (Abbildung 3-39). Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass die AH durch Sauerstoff nicht geschädigt wird. Hingegen zerfällt sie unter H_2 mit der Zeit, wenn der anwesende Wasserstoff am aktiven Zentrum gespalten wird, aber mangels eines Elektronenakzeptors keine Katalyse stattfinden kann.

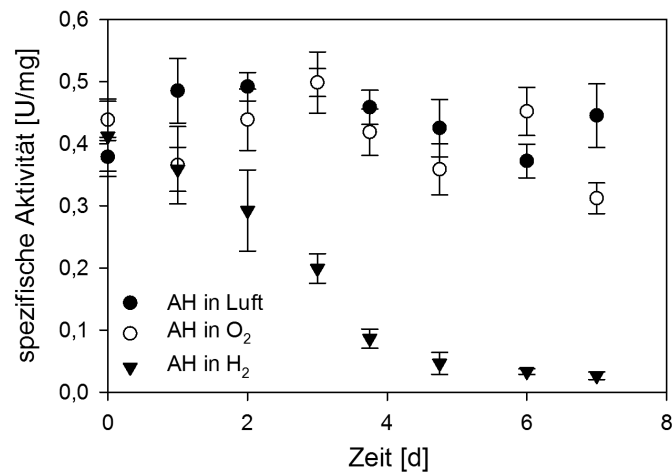


Abbildung 3-39: Stabilität der AH unter verschiedenen Atmosphären. Gereinigte AH wurde bei 4 °C an Luft (gefüllte Kreise), unter reinem Sauerstoff (offene Kreise) und unter Wasserstoff (Dreiecke) inkubiert. Die H₂-Oxidationsaktivität der AH wurde regelmäßig bestimmt.

3.6.6.2 Die AH bleibt auch bei einer Temperatur von 80 °C über mehrere Minuten katalytisch aktiv

Während der Versuche zur Aktivität der AH bei hohen Temperaturen (Kapitel 3.6.4) wurde beobachtet, dass das Enzym seine Aktivität bei 80 °C für einige Minuten behielt. Daher wurden Messungen durchgeführt, um präzisere Aussagen über die Stabilität der AH bei hohen Temperaturen zu gewinnen. Hierzu wurde die AH für variable Zeiträume bei 60 °C bzw. 80 °C inkubiert und anschließend die H₂-Oxidationsaktivität bei 30 °C bestimmt.

Bei 4 °C ist die AH über einige Tage stabil (vgl. Kapitel 3.6.6.1); bei 30 °C einige Stunden lang. Noch bei einer Temperatur von 60 °C wurde eine Halbwertszeit von 76 ± 13 min bestimmt (Abbildung 3-40). Bei 80 °C wurde eine Halbwertszeit von $3,5 \pm 0,2$ min ermittelt, die noch ausreichend lang ist, um Aktivitätsmessungen vorzunehmen (Abbildung 3-41).

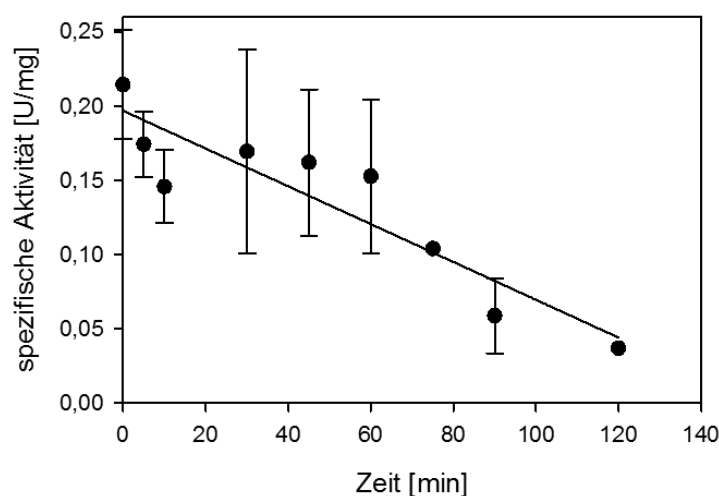


Abbildung 3-40: Stabilität der AH bei 60 °C. Die AH wurde unterschiedlich lange bei 60 °C inkubiert; anschließend wurde die H₂-Oxidationsaktivität der AH bei 30 °C bestimmt. Die erhaltenen Werte konnten am besten mittels der abgebildeten Geraden beschrieben werden ($R^2=0,837$). Aus der Regressionsgeraden wurde die Zeit der halbmaximalen Aktivität bestimmt.

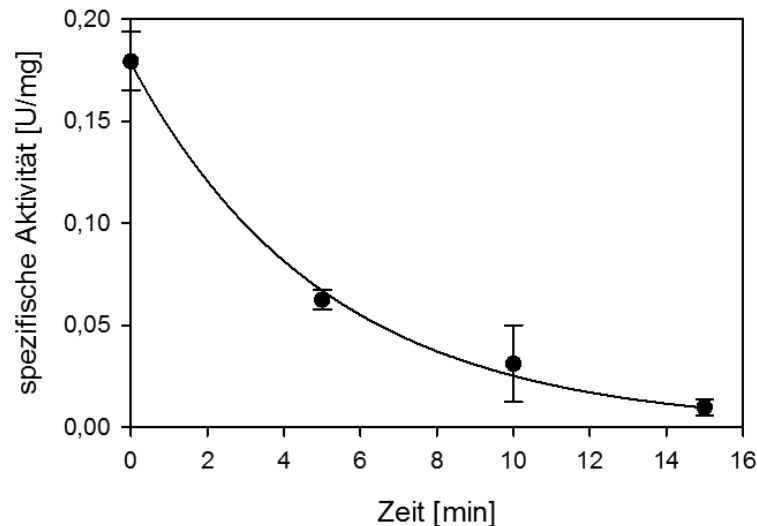


Abbildung 3-41: Stabilität der AH bei 80 °C. Die AH wurde unterschiedlich lange bei 80 °C inkubiert; anschließend wurde die H₂-Oxidationsaktivität der AH bei 30 °C bestimmt. Aus den Messwerten wurde mittels nichtlinearer Regression die Halbwertszeit ermittelt. Die Regressionskurve ist abgebildet.

3.6.7 Die H₂-Oxidationsaktivität der AH wird durch Sauerstoff nicht beeinflusst

Eine besondere Eigenschaft der Hydrogenasen in *R. eutropha* ist die ausgesprochene Toleranz gegenüber der Anwesenheit von Sauerstoff. Im Gegensatz zu den meisten anderen Hydrogenasen bleibt ihre katalytische Aktivität auch in Gegenwart von Sauerstoff erhalten (Fritsch *et al.*, 2013, Lenz *et al.*, 2010, Ludwig *et al.*, 2009a). Daher wurde auch für die AH das katalytische Verhalten in Gegenwart von Sauerstoff untersucht.

Diese Bestimmungen konnten nicht spektrophotometrisch durchgeführt werden, da das durch die katalytische Aktivität der AH reduzierte NBT in Gegenwart von Sauerstoff reoxidiert wird, und somit fälschlicherweise zu geringe Aktivität der AH bestimmt wird. Deshalb wurden die Experimente zur Sauerstofftoleranz der AH an einer modifizierten Clark-Elektrode durchgeführt. Diese ermöglicht die direkte Detektion des H₂-Gehalts im Messansatz und somit die Bestimmung der H₂-Oxidationsaktivität der AH mit NBT als Akzeptor auch in Gegenwart von Sauerstoff.

Für die Bestimmungen wurden neben einer konstanten Menge H₂-gesättigten Puffers (30 %; 227 µM H₂) N₂- und O₂-gesättigte Puffer in variablen Anteilen eingesetzt. Der Anteil des O₂-gesättigten Puffers wurde zwischen 0 und 70 % des Messvolumens (entsprechend 0-780 µM O₂) variiert. Dabei wurde über den gesamten Messbereich keine Veränderung der Aktivität festgestellt (Abbildung 3-42). Diese Eigenschaft ist auch für die regulatorischen Hydrogenasen (Gruppe 2b) beschrieben worden, aber nicht für energiekonservierende Hydrogenasen (Vignais *et al.*, 1997; Bernhard *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2007; Ludwig *et al.*, 2009a).

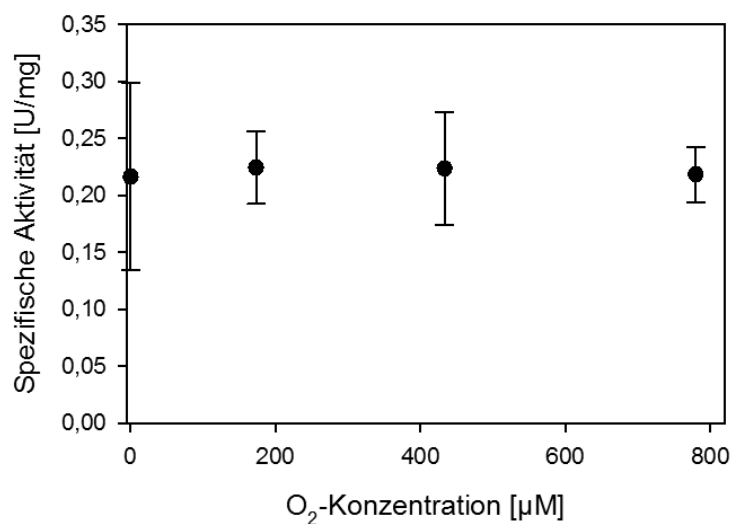


Abbildung 3-42: H₂-Oxidationsaktivität der AH bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Aktivität gereinigter AH wurde amperometrisch mit variablen Anteilen O₂-gesättigtem Puffer (0-70%; entsprechend 0-780 μM) und 30 % H₂-gesättigtem Puffer (227 μM; Rest N₂-gesättigter Puffer) mit 75 μM NBT als Elektronenakzeptor bestimmt.

3.7 Untersuchungen zum Redoxverhalten und katalytischen Zyklus der AH

Die Analyse der AH-Kristallstruktur offenbarte die Zusammensetzung der Cofaktoren des Enzyms. Diese Daten liefern jedoch keine Informationen zu den Redoxzuständen der Cofaktoren und dem katalytischen Zyklus der AH. Um Informationen zur Funktion der Metallcofaktoren in der AH zu erhalten, wurden daher Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) und Infrarotspektroskopie (IR) eingesetzt. In der EPR-Spektroskopie werden durch Mikrowellen induzierte Änderungen von Elektronenspins in einem Magnetfeld beobachtet. Dies ist nur mit Systemen mit ungepaarten Elektronen möglich; es können also nur paramagnetische Spezies erfasst werden. Hierzu zählen unter anderem [FeS]-Cluster und das [NiFe]-Zentrum in den entsprechenden Redoxzuständen. Informationen zum [NiFe]-Zentrum können insbesondere auch mittels IR-Spektroskopie gewonnen werden, in der aus den Schwingungsfrequenzen der CO- und CN-Liganden des aktiven Zentrums Rückschlüsse auf dessen Redoxzustand und Bindungssituation möglich sind. Die spektroskopischen Untersuchungen der AH wurden am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion in Mülheim/Ruhr von Dr. Olaf Rüdiger und Dr. Federico Roncaroli durchgeführt.

3.7.1 Die Cofaktoren der AH sind EPR-inaktiv

EPR-Spektren der AH wurden zunächst im oxidierten Zustand aufgezeichnet, wie er nach der Reinigung vorliegt. Hierbei konnten keine spezifischen Signale identifiziert werden. In einem Teil der erhaltenen Spektren wurden jedoch Signale beobachtet, die Cu^{2+} -Ionen zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Cu^{2+} -Ionen waren offenbar als Verunreinigung in einigen Proben enthalten. Die Abschätzung der Cu-Menge in den Proben ergab Mengen von etwa 0,05 Cu pro AH-Molekül. Die Metallbestimmung ergab überdies keine Hinweise auf signifikante Mengen an Kupfer in den Proben (Kapitel 3.4.4). Somit konnte Kupfer als Bestandteil der AH ausgeschlossen werden. Die Proben wurden im Anschluss unter H_2 inkubiert, um die AH zu reduzieren. Von den reduzierten Proben wurden erneut EPR-Spektren aufgezeichnet. Auch unter diesen Bedingungen wurden jedoch keine Signale der Cofaktoren der AH detektiert.

Da weder im oxidierten noch im mit H_2 reduzierten Zustand Signale des [NiFe]-Zentrums oder von [FeS]-Clustern gefunden wurden, treten offenbar ausschließlich EPR-inaktive Zustände auf. Die Möglichkeit, dass die Proben durch die Inkubation mit H_2 nicht reduziert werden konnten, ist hingegen sehr unwahrscheinlich, da Inkubation mit H_2 eindeutig zu einer Verschiebung der mittels IR-Spektroskopie sichtbaren Signale führte (Kapitel 3.7.2).

3.7.2 IR-Spektroskopie an der AH deutet auf zwei interkonvertierbare Isoformen hin, die jeweils unterschiedliche Zustände besitzen

Mittels Infrarotspektroskopie sollte aufgeklärt werden, ob die AH wie andere [NiFe]-Hydrogenasen ebenfalls zwei Cyanid- und einen Carbonylliganden am aktiven Zentrum besitzt und welche der in konventionellen [NiFe]-Hydrogenasen detektierten zahlreichen Redoxzustände auch in der AH vorliegen. Hierzu wurden einerseits Experimente gemacht, in denen IR-Spektren des oxidierten und des mit H_2 reduzierten Enzyms aufgezeichnet wurden. Zum Anderen wurden spektroelektrochemische Experimente durchgeführt, bei denen das elektrochemische Potential in der AH-Probe über einen bestimmten Bereich variiert und dabei in regelmäßigen Potentialintervallen ein IR-Spektrum aufgezeichnet wurde.

Mit der ersten Methode wurden zunächst Spektren gewonnen, welche im oxidierten Zustand der AH drei deutliche Signale bei Wellenzahlen von 1942, 2100 und 2107 cm^{-1} zeigten. Diese Signale lassen sich einem CO-Liganden (1942 cm^{-1}) sowie zwei CN^- -Liganden (2100 und 2107 cm^{-1}) zuordnen. Die Ligandierung des [NiFe]-Zentrums ist somit identisch zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen; auch der Wellenzahlbereich der Signale ist ähnlich zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen (De Lacey *et al.*, 1997; Pierik *et al.*, 1998; Bleijlevens *et al.*, 2004; Fichtner *et al.*, 2006; Saggu *et al.*, 2009). Im durch H_2 reduzierten Zustand der AH wurden ebenfalls drei Signale gefunden, wobei das CO-Signal auf 1930 cm^{-1} und die CN^- -Signale auf 2073 bzw. 2086 cm^{-1} verschoben waren (Abbildung 3-43). Ein weiteres Signal, das in einigen dieser Proben bei 1946 cm^{-1} auftauchte und bei Reduktion der Probe unverändert blieb, wurde als inaktiver Bestandteil der Probe eingestuft. Die AH scheint in diesen Proben somit über genau einen oxidierten und einen reduzierten Zustand im Katalysezyklus der H_2 -Oxidation zu verfügen. Mit Spektroelektrochemie wurde diese Beobachtung bestätigt und ein Mittelpunktspotential der Reduktion von -247 ± 10 mV bestimmt (Abbildung 3-44). Die Anpassung der Intensitäten der CO-Banden aus den einzelnen Spektren gemäß der Nernst-Gleichung ergab, dass es sich bei der Reduktion um einen Zweielektronenprozess handelt, wie für die Oxidation von H_2 zu 2H^+ erwartet werden kann.

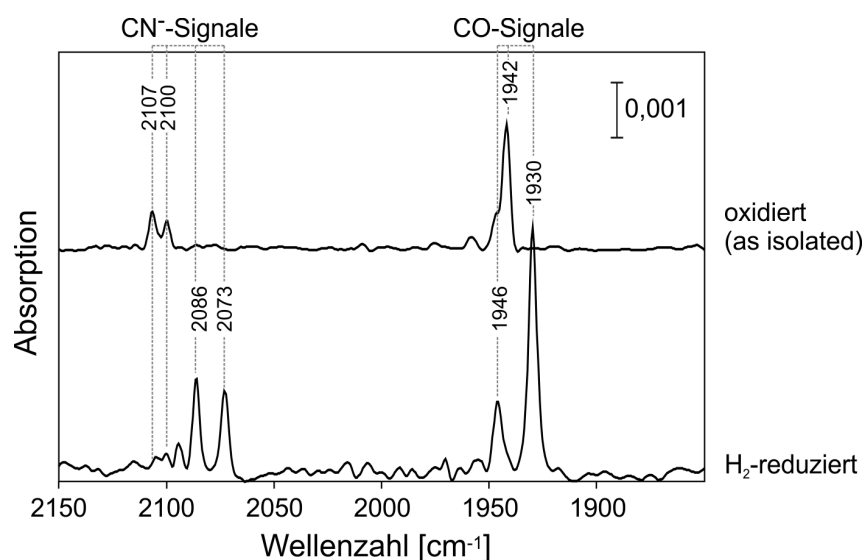


Abbildung 3-43: Basislinienkorrigierte FTIR-Spektren der AH im unbehandelten (oxidierten) Zustand (oberer Teil) und nach Reduktion durch H_2 (unterer Teil).

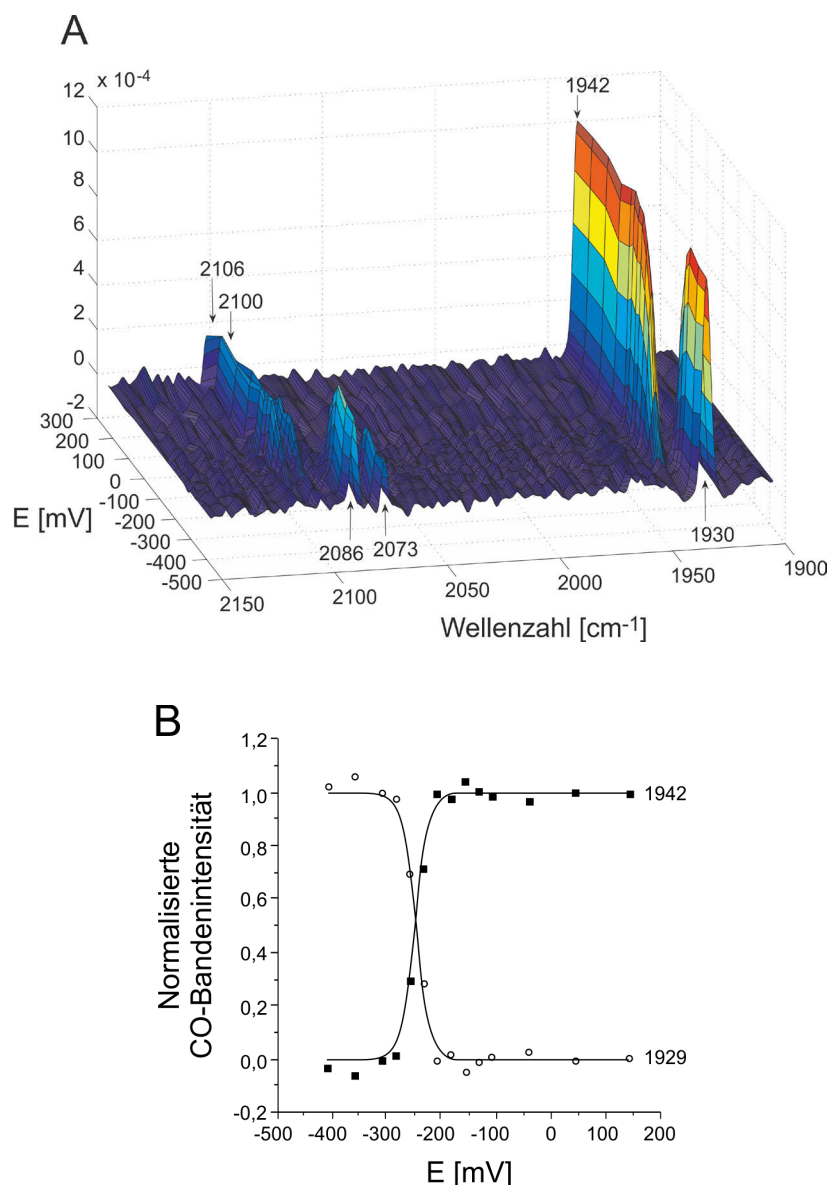


Abbildung 3-44: A) FTIR-Spektren der AH in Abhängigkeit vom Redoxpotential (bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode) der Probe. Die Proben wurden elektrochemisch mit Hilfe von Redoxmediatoren auf bestimmte Potentiale eingestellt und bei jedem Potential FTIR-Spektren aufgezeichnet. B) Anpassung der normalisierten CO-Banden gemäß der Nernst-Gleichung für einen Zweielektronenprozess. Die Bandenintensität wurde auf die Intensität der CO-Bande des oxidierten Zustandes normalisiert.

In einer Reihe anderer Proben wurden bei spektroelektrochemischen Messungen jedoch weitere Zustände gefunden. In diesen Proben, welche sowohl aus dem Stamm HF901 als auch aus dem Stamm HF1035 isoliert worden waren, traten jeweils zwei oxidierte und zwei reduzierte Zustände sowie ein intermediärer Zustand auf. Neben den bereits beschriebenen Zuständen trat ein weiterer oxidierte Zustand mit den Wellenzahlen 1934, 2086 und 2094 cm⁻¹ auf sowie ein weiterer reduzierter Zustand mit den Wellenzahlen 1944 und 2094 cm⁻¹ (die Wellenzahl des dritten Signals konnte nicht ermittelt werden). Ein intermediärer Zustand mit den Wellenzahlen 1957, 2072 und 2086 cm⁻¹ trat im Potentialbereich zwischen -300 mV und -350 mV auf (Abbildung 3-45).

Eine wahrscheinliche Erklärung für das Auftreten dieser weiteren Zustände in der Mehrzahl der Proben ist das Vorkommen einer weiteren Spezies. Zu einer Spezies A dürften in diesem Fall die in allen Proben beobachteten Zustände mit der CO-Bande bei 1942 cm^{-1} im oxidierten und 1930 cm^{-1} im reduzierten Fall gehören. Die Spezies B, welche nicht in allen Proben vorkommt, ist dagegen durch CO-Banden bei 1934 cm^{-1} im oxidierten und 1944 cm^{-1} im reduzierten Zustand sowie einer CO-Bande bei 1957 cm^{-1} als „Intermediat“ gekennzeichnet.

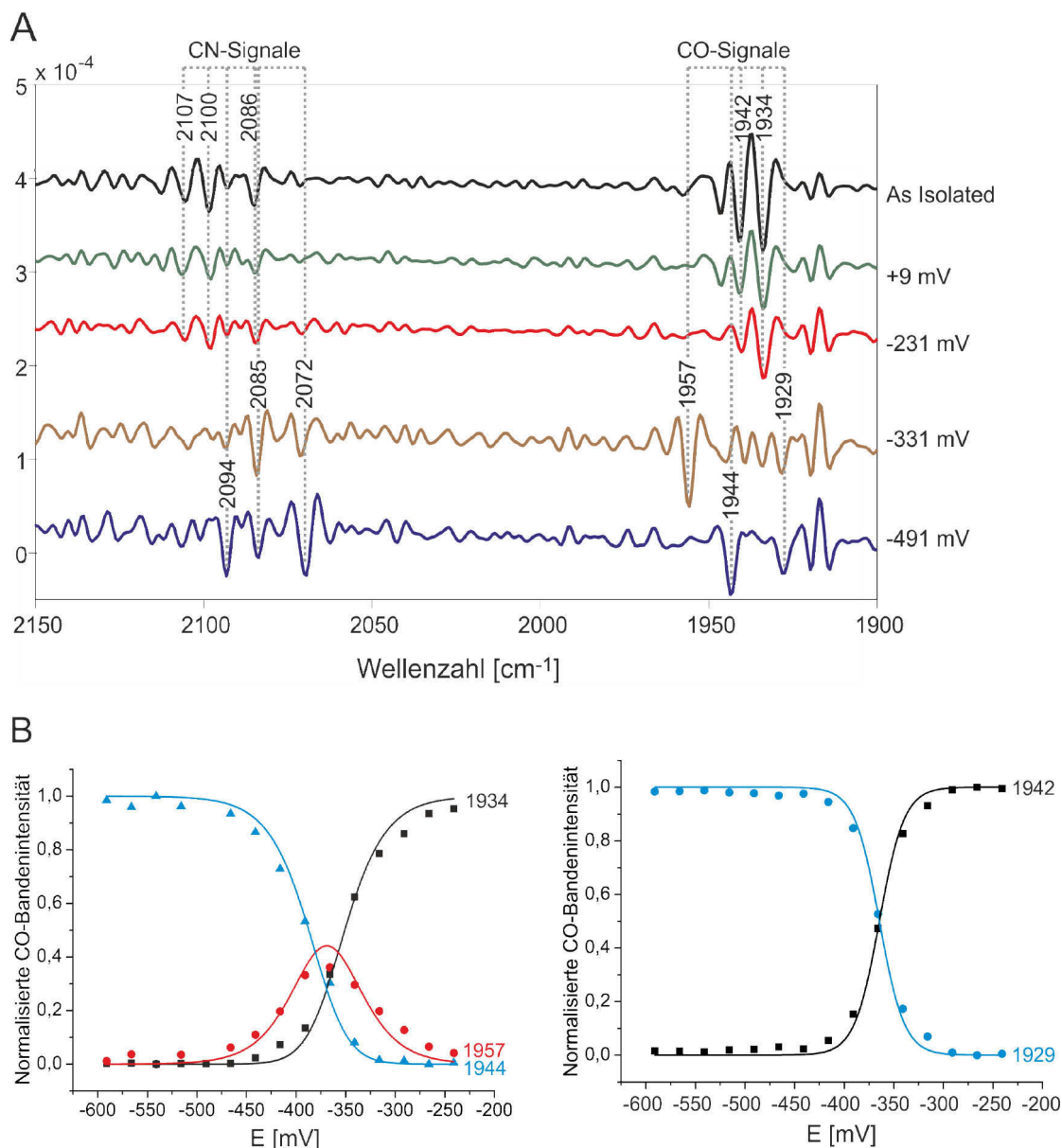


Abbildung 3-45: A) FTIR-Spektren der AH bei verschiedenen Redoxpotentialen (bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode), dargestellt in der zweiten Ableitung. Die Proben wurden elektrochemisch ohne Hilfe von Redoxmediatoren auf bestimmte Potentiale eingestellt und bei jedem Potential FTIR-Spektren aufgezeichnet. Die Wellenzahlen der CN- und CO-Signale sind den verschiedenen Spektren zugeordnet und durch vertikale graue Linien verdeutlicht. B) Anpassung der CO-Bandenintensitäten an die Nernst-Gleichung unter der Hypothese, dass es eine Spezies A mit zwei Zuständen (rechter Teil) und eine Spezies B mit drei Zuständen (linker Teil) gibt. Die Wellenzahlen der verwendeten CO-Signale sind am rechten Rand der dazu gehörigen Kurve notiert. Die Bandenintensitäten wurden jeweils auf die Intensitäten der CO-Bande des oxidierten Zustandes normalisiert.

Eine exakte Benennung der beobachteten Zustände ist mit den vorhandenen Daten schwierig. Da jedoch keine Signale in der EPR-Spektroskopie gefunden wurden, erscheint es sinnvoll, die oxidierten Zustände vorläufig als $\text{Ni}_a\text{-S}_{\text{A+B}}$ und die reduzierten Zustände als $\text{Ni}_a\text{-R}_{\text{A+B}}$ zu bezeichnen. Der intermediäre Zustand kann mit relativer Sicherheit als $\text{Ni}_a\text{-C}$ bezeichnet werden, da eine große Ähnlichkeit sowohl des Auftretens als auch der Bandenpositionen zu entsprechenden Zuständen anderer Hydrogenasen besteht (Saggu *et al.*, 2009). Dieser Zustand müsste mit EPR-Spektroskopie detektierbar sein, jedoch wurde diese bislang ausschließlich an Proben durchgeführt, welche nur den oxidierten und den reduzierten Zustand zeigten. Damit ergibt sich ein vorläufiges Schema der Redoxzustände und -übergänge, welches in Abbildung 3-46 dargestellt ist. Die Zuordnung der Zustände und eine mögliche Begründung dafür, dass in verschiedenen Proben unterschiedliche Zustände gefunden werden, werden in Kapitel 4.3.2 diskutiert.

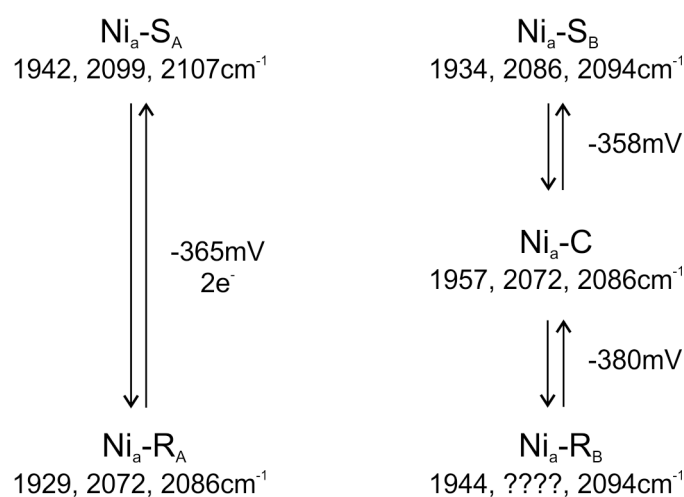


Abbildung 3-46: Vorläufiges Schema der Redoxzustände und -übergänge der AH mit den ermittelten Potentialen der Übergänge. Die Zugehörigkeit zu Spezies A und B ist durch die Indices A bzw. B gekennzeichnet.

3.8 Der Austausch des Aspartats am proximalen Cluster durch andere Aminosäuren beeinträchtigt die O_2 -Toleranz der AH

Die kleine Untereinheit der AH trägt ein Aspartat anstelle eines sonst auftretenden Cysteins zur Koordination den proximalen $[\text{4Fe4S}]$ -Clusters (Kapitel 3.5.3). Das Aspartat ist in den Sequenzen aller Gruppe 5-Hydrogenasen codiert und stellt ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppe dar. Für die MBH aus *R. eutropha* wurde gezeigt, dass deren Sauerstofftoleranz maßgeblich durch zwei zusätzliche Cysteine am proximalen $[\text{FeS}]$ -Cluster verursacht wird, wodurch aus dem normalen durch vier Cysteine koordinierten $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster ein durch sechs Cysteine ligandierter $[\text{4Fe3S}]$ -Cluster entsteht (Goris *et al.*, 2011, Fritsch *et al.*, 2011b). Daher wurde untersucht, ob das ungewöhnliche Aspartat am proximalen $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster der AH ebenfalls an der Vermittlung der Sauerstofftoleranz beteiligt ist.

Für diese Studie wurden Varianten der AH konstruiert, in denen das Aspartat am proximalen [FeS]-Cluster gegen verschiedene andere Aminosäuren ausgetauscht wurde. Hierfür wurden die Stämme *R. eutropha* HF1048 bis HF1053 konstruiert, die verschiedene Mutationen in der Gensequenz der kleinen Untereinheit *hofK* tragen. Die Gene *hofK* und *hofG* werden in diesen Stämmen analog zu dem Stamm HF1038 auf einem Plasmid codiert und stehen unter der Kontrolle des SH-Promoters. Es wurden Varianten der AH konstruiert, die anstelle des Aspartats entweder ein Cystein, Serin, Histidin, Asparagin, Alanin oder Glycin tragen. Eine Übersicht über die Substitutionen ist in Tabelle 3-4 zu finden.

Die Mutanten-Stämme wurden in FGN_{mod}-Medium kultiviert und die entsprechenden AH-Varianten nach demselben Protokoll wie das Wildtyp-Protein isoliert (Kapitel 3.3.3). Aus allen Stämmen konnte die AH isoliert werden, allerdings in unterschiedlichen Mengen. Während für die AH-Varianten D35C, D35S, D35N und D35A mittelmäßige bis gute Ausbeuten erzielt wurden, wurde die Variante D35H nur in geringen Mengen und in einem unreinen Zustand erhalten (Abbildung 3-47). Die H₂-Oxidationsaktivitäten der Varianten wurden spektrophotometrisch bestimmt. Für alle Varianten der AH konnte H₂-Oxidationsaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 3-4). Dabei lagen die spezifischen Aktivitäten jeweils in vergleichbarer Größenordnung zur Aktivität des nativen Enzyms, lediglich für die Variante D35H wurde eine geringe Restaktivität bestimmt. Offenbar wird die Struktur der AH durch diese Mutation gestört, sodass das Enzym kaum funktional ist. In den aktiven Mutanten-Enzymen hingegen liegen offenbar trotz der veränderten Koordination funktionale proximale [FeS]-Cluster vor, sodass die Aktivität der AH zumindest unter anaeroben Bedingungen erhalten bleibt.

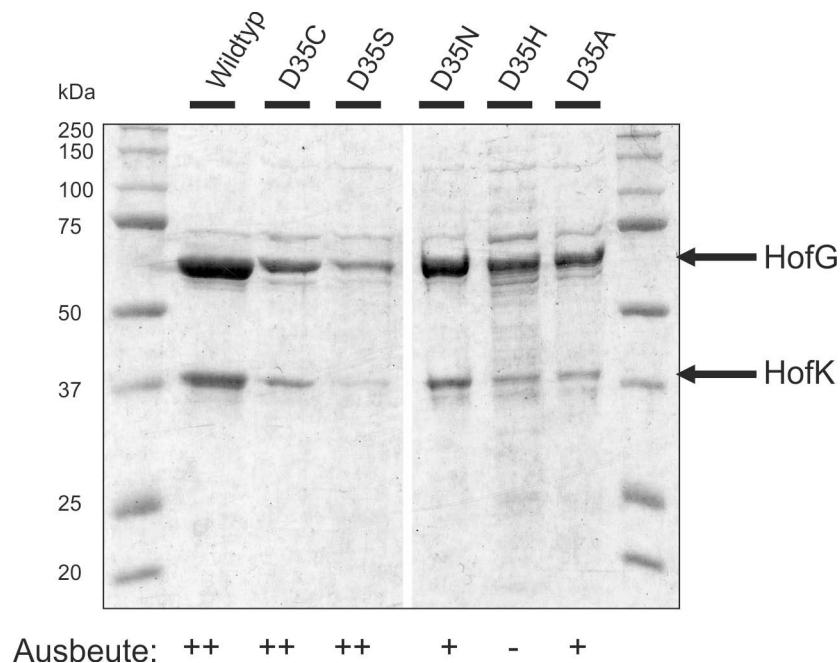


Abbildung 3-47: SDS-PAGE der gereinigten AH-Varianten. Die Variante D35H konnte nur in geringer Reinheit mit einer schlechten Ausbeute erhalten werden. Die gereinigten AH-Varianten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbestandteile mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Tabelle 3-4: Stämme von *R. eutropha* mit Mutationen des Aspartats am proximalen [FeS]-Cluster der AH sowie spezifische Aktivitäten dieser Stämme in An- und Abwesenheit von Sauerstoff.

Stamm	Aspartat ersetzt durch	Spezifische H ₂ -Oxidationsaktivität der AH ^a [U/mg]	
		ohne O ₂	mit O ₂
HF1035	keine Mutation	0,22±0,08 ^a	0,22±0,02 ^a
HF1049	Cystein (D35C)	0,16±0,02	0,12±0,07
HF1048	Serin (D35S)	0,13±0,04	0,06±0,02
HF1053	Asparagin (D35N)	0,44±0,14	0,31±0,11 ^b
HF1052	Alanin (D35A)	0,18±0,05	0,10±0,02 ^b
HF1050	Histidin (D35H)	0,07±0,01	nicht bestimmt

^a Die spezifischen H₂-Oxidationsaktivitäten der AH-Varianten wurden im Gegensatz zu den in Tabelle 3-2 präsentierten Aktivitäten nicht spektrophotometrisch, sondern amperometrisch bestimmt. Daher ergeben sich leicht unterschiedliche Werte für die H₂-Oxidationsaktivität des Wildtyp-Proteins.

^b Bei den Messungen mit durch O₂ inaktivierten Varianten der AH in Gegenwart von O₂ wurden die Anfangsaktivitäten verwendet.

Die Aktivitäten der AH-Varianten wurden amperometrisch wie in Kapitel 3.6.7 beschrieben in Gegenwart von Sauerstoff bestimmt. Dabei zeigten die verschiedenen Varianten ein unterschiedliches Verhalten. Die Varianten D35A und D35N wurden in Anwesenheit von Sauerstoff schnell inaktiviert. Die in den Messungen der entsprechenden Proben anfänglich beobachtete Abnahme der H₂-Konzentration verringerte sich in Anwesenheit von O₂ schnell, während die Enzymaktivität in anaeroben Messungen über einen längeren Zeitraum erhalten blieb (Abbildung 3-48; gezeigt sind nur Verbrauchskurven der Variante D35N, die Kurven der Variante D35A sehen identisch aus). Die in aeroben Messungen anfänglich beobachtete Aktivität dieser AH-Varianten war zudem geringer als in sauerstofffreien Messungen. Eine Inaktivierung durch O₂ wurde in den AH-Varianten D35C und D35S nicht beobachtet. Diese Varianten betrieben in Gegenwart von O₂ weiterhin Katalyse, jedoch ebenfalls mit gegenüber der sauerstofffreien Messung verringerter Aktivität. Diese Varianten sind somit offenbar wie der Wildtyp tolerant gegenüber Sauerstoff, jedoch liegt möglicherweise eine gegenüber dem nativen Enzym veränderte Art der Sauerstofftoleranz vor. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Aspartat am proximalen [FeS]-Cluster der AH eine Rolle bei der Vermittlung der Sauerstofftoleranz spielt. Die aufgrund der stark schwankenden Messwerte großen Standardabweichungen legen allerdings nahe, weitere Untersuchungen der beschriebenen Mutanten anzustellen, die unter Anderem eine Quantifizierung der Sauerstoffinhibition der Varianten D35N und D35A beinhalten sollten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine vorläufige Untersuchung der beschriebenen Varianten der AH durchgeführt werden. Für eine endgültige Beurteilung der Auswirkungen der Mutationen sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die vorhandenen Daten durch weitere Messungen abzusichern.

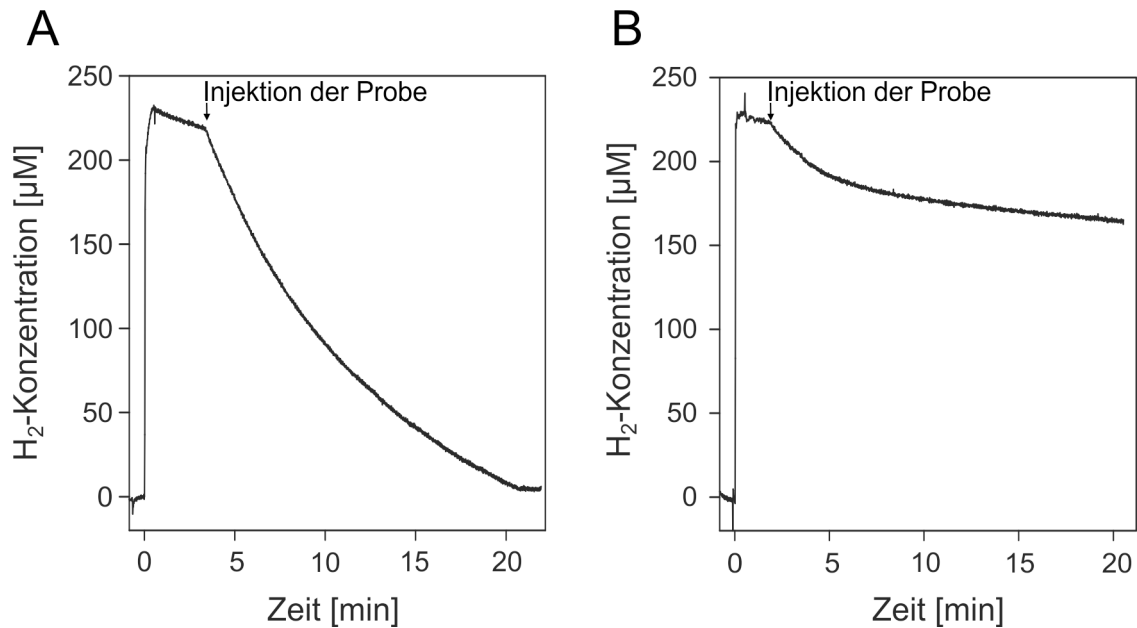


Abbildung 3-48: Amperometrisch bestimmte H₂-Verbrauchskurven von O₂-inaktivierbaren Varianten der AH. A) H₂-Verbrauchskurve der Variante D35N ohne O₂ im Reaktionsansatz. B) H₂-Verbrauchskurve der Variante D35N mit 780 µM O₂ im Reaktionsansatz. Für die Variante D35A wurden identische H₂-Verbrauchskurven erhalten.

3.9 Heterologe Expression der Gruppe 5-Hydrogenasen aus *Streptomyces avermitilis* und *Mycobacterium smegmatis* in *Ralstonia eutropha*

Die AH aus *Ralstonia eutropha* wurde durch die in den vorhergehenden Kapiteln präsentierten Daten eingehend charakterisiert. Im Gegensatz zu den Daten von Constant *et al.*, 2010, die eine extrem hohe Affinität für H₂ als charakteristisches Merkmal der Gruppe 5-Hydrogenasen vermuten lassen, konnte Selbige für die AH nicht gezeigt werden. Daher sollte untersucht werden, ob dieser Unterschied in den Affinitäten zwischen der AH und den Gruppe 5-Hydrogenasen verschiedener *Streptomyces*-Stämme auf grundsätzliche Eigenschaften der Enzyme zurückzuführen ist.

3.9.1 Die Gruppe 5-Hydrogenase aus *Streptomyces str. PCB7* unterscheidet sich in ihren Eigenschaften von der AH

Streptomyces str. PCB7 war der erste Organismus, für den eine extrem hohe Affinität für H₂ nachgewiesen wurde, wodurch die Aufnahme von H₂ aus der Luft ermöglicht wird (Constant *et al.*, 2008). Diese Eigenschaft wurde auf die in diesem Bakterium codierte Gruppe 5-Hydrogenase zurückgeführt. Daher wurden Extrakte aus *Streptomyces str. PCB7* und *R. eutropha* in Zusammenarbeit mit Philippe Constant (MPI Marburg, heute IRNS-Institut Armand Frappier, Laval/Quebec, Kanada) simultan untersucht. Hierfür wurde das Extrakt aus Sporen von *Streptomyces str. PCB7* gewonnen und gemeinsam mit dem löslichen Extrakt aus *R. eutropha* mittels CN-PAGE aufgetrennt. Die in den Extrakten enthaltenen Hydrogenasen wurden im Anschluss durch Aktivitätsfärbung mit den Elektronenakzeptoren PMS und NBT sichtbar gemacht (Abbildung 3-49).

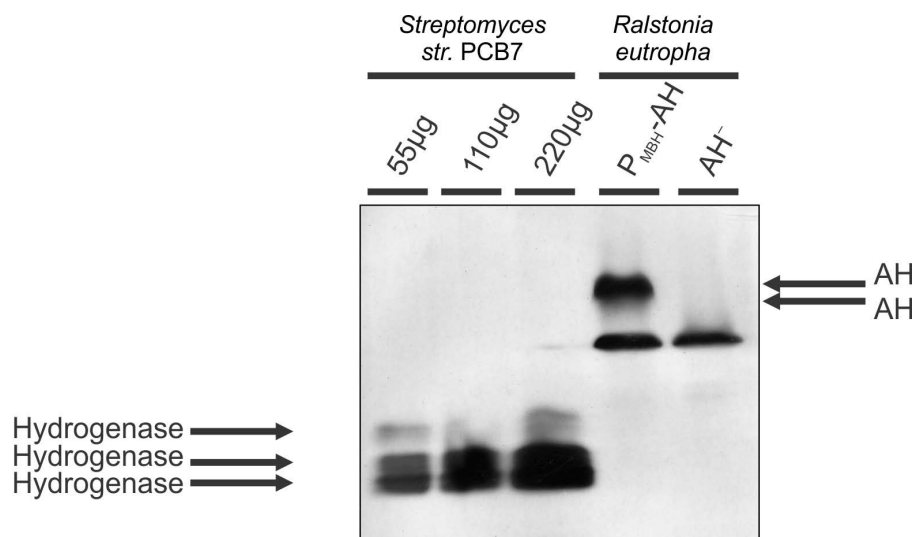


Abbildung 3-49: Banden der H₂-Oxidationsaktivität der Gruppe 5-Hydrogenasen aus *Streptomyces str. PCB7* und aus *R. eutropha*. Sporenextrakte von *Streptomyces str. PCB7* und lösliche Extrakte von den Stämmen *R. eutropha* HF864 (P_{MBH}-AH) und HF866 (AH⁻) wurden mittels CN-PAGE aufgetrennt und die hydrogenaseabhängige H₂-Oxidationsaktivität im Gel durch PMS/NBT sichtbar gemacht.

Überraschenderweise wurden für die Hydrogenaseaktivität beider Extrakte stark voneinander abweichende Bandenmuster gefunden (Abbildung 3-49). Während man für die AH die bereits in Kapitel 3.1.2 beschriebene Doppelbande erahnen kann, wurde im Extrakt aus *Streptomyces str. PCB7* ein Muster aus drei Banden gefunden, welche im Gel deutlich tiefer laufen als die Banden der AH. Somit existiert ein erheblicher Unterschied im Laufverhalten der Hydrogenasen in nativen Gelen. Die genaue Gen- und Aminosäuresequenz der Hydrogenase aus *Streptomyces str. PCB7* ist unbekannt, jedoch lässt sich das Gen ihrer kleinen Untereinheit wie die überwiegende Anzahl der Gruppe 5-Hydrogenase-Gene mit Primern für *Streptomyces avermitilis* amplifizieren (Constant *et al.*, 2010). Daher sollten auch diese Gene große Ähnlichkeit zu anderen Gruppe 5-Hydrogenasen besitzen.

Ein wichtiger Faktor für das Migrationsverhalten eines Proteins im nativen Gel ist der isoelektrische Punkt des Proteins. Für die AH, bestehend aus HofK und HofG, wird hierfür ein Wert von 6,2 berechnet. Der isoelektrische Punkt der Hydrogenase aus *Streptomyces str. PCB7* ist aufgrund der fehlenden Aminosäuresequenz unbekannt, müsste aber deutlich saurer als derjenige der AH sein, um einen derartigen Unterschied im Laufverhalten zu verursachen. Ein veränderter isoelektrischer Punkt und damit das veränderte Laufverhalten ist möglicherweise auch durch eine zusätzliche Untereinheit zu erklären, die beispielsweise analog zu HoxZ für die MBH in *R. eutropha* ein primärer Elektronenakzeptor der Hydrogenase sein könnte. Das Auftreten von drei Banden mit Hydrogenaseaktivität spricht für eine gegenüber der AH veränderte Zusammensetzung der Hydrogenase aus *Streptomyces str. PCB7*.

3.9.2 Versuche zur heterologen Produktion der Gruppe 5-Hydrogenasen aus *Streptomyces avermitilis* und *Mycobacterium smegmatis* in *Ralstonia eutropha*

Um detailliertere Aussagen darüber zu erhalten, ob und wie sich Gruppe 5-Hydrogenasen voneinander unterscheiden, sollten die Gruppe 5-Hydrogenasen aus verschiedenen Organismen in *R. eutropha* heterolog produziert werden. Hierfür wurden die Enzyme aus *Streptomyces avermitilis* (DSM 46492^T), *Streptomyces str.* PCB7 sowie *Mycobacterium smegmatis* (DSM 43756^T) ausgewählt, da in diesen Organismen Hinweise auf aktive Gruppe 5-Hydrogenasen gefunden wurden (Constant *et al.*, 2008; Constant *et al.*, 2010; Berney & Cook, 2010).

Da in den bekannten Operons der Gruppe 5-Hydrogenasen jeweils alle zur Maturation benötigten Faktoren codiert sind, und diese trotz phylogenetischer Variabilität der Wirtsorganismen große Sequenzähnlichkeit besitzen, wurden jeweils nur die Gene der zwei Hydrogenase-Untereinheiten in *R. eutropha* übertragen. Die Gensequenz von *Streptomyces str.* PCB7 ist jedoch unbekannt. In *Streptomyces*-Spezies wurden die Gene der zwei Untereinheiten als *hhyS* und *hhyL* (high-affinity hydrogenase) benannt. Diese Terminologie wurde für die Gene der AH in *R. eutropha* jedoch nicht übernommen, da sie in offensichtlichem Widerspruch zu den erhaltenen Ergebnissen steht.

Für die heterologe Produktion der genannten Hydrogenasen sollten die Strukturgene plasmidgebunden im Stamm *R. eutropha* HF1038 unter der Kontrolle des SH-Promotors überexprimiert werden. Die im AH-Operon auf dem Megaplasmid pHG1 codierten Reifungsfaktoren sollten die Maturation der Hydrogenasen gewährleisten. Hierzu wurden zunächst die Gene *hhyS* und *hhyL* aus den Genomen der Spenderorganismen jeweils gemeinsam amplifiziert. Dies war möglich, da die Strukturgene in den Operons soweit bekannt stets zusammen liegen. Dabei wurden die *hhySL*-Gene unter Verwendung eines Primers für das 5'-Ende von *hhyS* amplifiziert, der eine *Strep*-Tag II codierende Sequenz enthielt, sodass im PCR-Produkt dem Gen *hhyS* die Sequenz des *Strep*-Tags II vorangestellt war. Aus der DNA von *Streptomyces str.* PCB7 konnte jedoch kein PCR-Produkt für *hhySL* amplifiziert werden.

Im Vektor pGE822 wurden die Gene *hofKG* mittels einer Rekombinase gegen die Amplifikate mit den Genen *hhySL* ausgetauscht, und die resultierenden Vektoren pGE827 (*hhySL* aus *S. avermitilis*) bzw. pGE828 (*hhySL* aus *M. smegmatis*) in *R. eutropha* HF1036 eingebracht. Hieraus resultierten die Stämme HF1040 und HF1041 (Abbildung 3-50). Die relevanten Bereiche aller Vektoren wurden sequenziert, die neu konstruierten Stämme wurden mittels Amplifikation spezifischer Abschnitte überprüft.

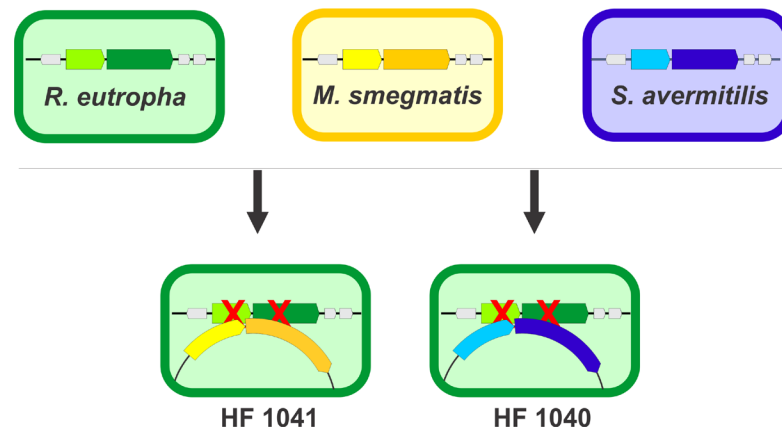


Abbildung 3-50: Schematische Darstellung der Mutanten von *R. eutropha* zur heterologen Expression der Gene *hhySL* aus *S. avermitilis* bzw. *M. smegmatis*. Die Organismen sowie die Gene der darin codierten Gruppe 5-Hydrogenasen sind durch spezifische Farbgebung gekennzeichnet.

Die erzeugten Stämme wurden mit verschiedenen Methoden auf das Vorhandensein der heterolog produzierten Hydrogenasen untersucht. Es wurde versucht, die Hydrogenasen gemäß Kapitel 3.3.1 aus *R. eutropha* zu isolieren, jedoch wurden im Eluat der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung für keinen der Stämme Banden gefunden, die den Hydrogenase-Untereinheiten HhySL zugeordnet werden konnten. In lebenden Zellen der Stämme konnte zudem kein Verbrauch von Wasserstoff nachgewiesen werden. Nichtsdestoweniger wurden Hinweise darauf erhalten, dass die heterolog produzierten Enzyme funktional vorliegen könnten. Die Aktivitätsfärbung von durch CN-PAGE aufgetrennten löslichen Extrakten der Stämme HF1040 und HF1041 zeigte ein schwach sichtbares Bandenmuster. Dieses Muster besteht aus drei Banden und ähnelt zudem in der Position im Gel den Banden, die für *Streptomyces str.* PCB7 gefunden worden waren (Abbildung 3-51; vgl. Abbildung 3-49).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur heterologen Produktion von Gruppe 5-Hydrogenasen sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. In den Stämmen HF1040 und HF1041 scheinen diesen Ergebnissen zufolge geringste Mengen aktiver Hydrogenase gebildet zu werden.

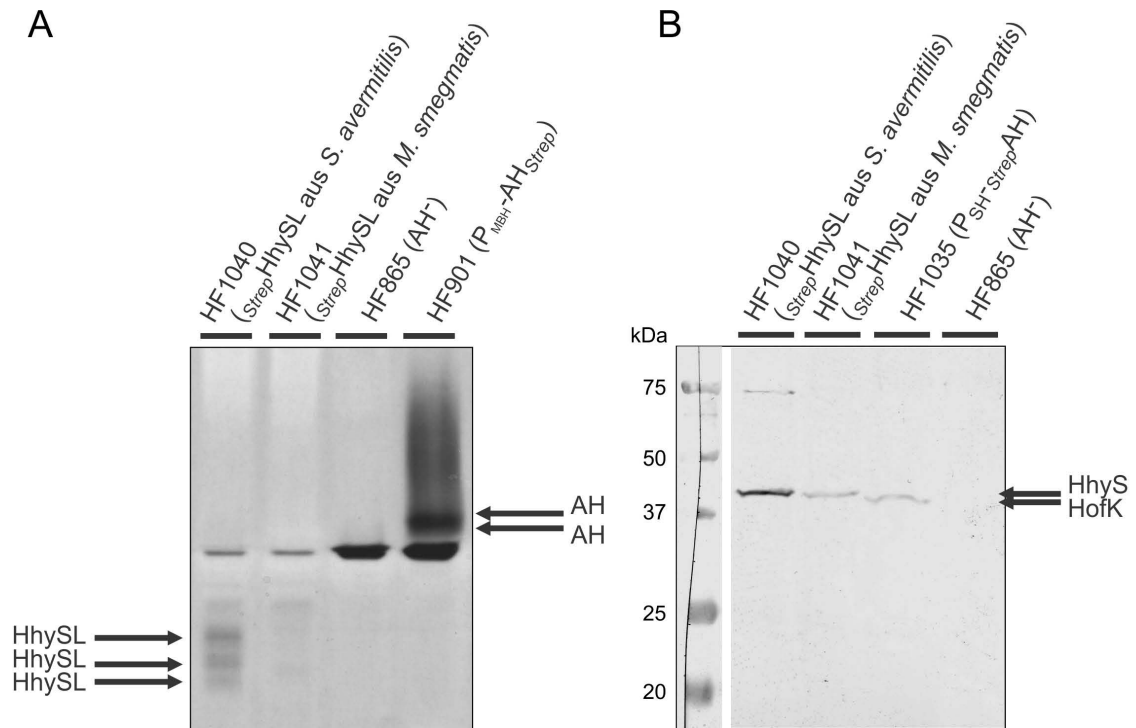


Abbildung 3-51: A) Hydrogenaseaktivität heterolog produzierter Gruppe 5-Hydrogenasen in *R. eutropha*. Lösliche Extrakte der Stämme HF1040 (*StrepHhySL* aus *S. avermitilis*), HF1041 (*StrepHhySL* aus *M. smegmatis*), HF866 (AH⁻) und HF901 (P_{MBH}-AH^{Strep}) wurden über CN-PAGE aufgetrennt und die Hydrogenaseaktivität mit PMS/NBT sichtbar gemacht. B) Nachweis des *StrepHhyS*- bzw. *StrepHofK*-Untereinheiten in ganzen Zellen der Stämme HF1040 (*StrepHhySL* aus *S. avermitilis*), HF1041 (*StrepHhySL* aus *M. smegmatis*), HF1035 (P_{SH}-*StrepAH*) und HF866 (AH⁻) als Negativkontrolle. Ganze Zellen der genannten Stämme wurden durch Kochen lysiert und die Bestandteile durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die einen *Strep*-Tag enthaltenden Proteine wurden durch einen Western-Blot und *Strep*-Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Tabelle 3-5: Übersicht über die Untersuchungen zur heterologen Produktion von Gruppe 5-Hydrogenasen in *R. eutropha*.

Stamm	HF1040 (<i>hhySL</i> aus <i>S. avermitilis</i>)	HF1041 (<i>hhySL</i> aus <i>M. smegmatis</i>)
Position von <i>hhySL</i>	Auf Plasmid unter P _{SH}	
PCR an ganzen Zellen		
Fragment ' <i>hhyL</i>	+	+
Fragment <i>Strep-hhyS</i> '	+	+
Western-Blot mit <i>Strep</i> -Antikörper		
ganze Zellen	+	+
<i>In-vivo</i> H ₂ -Verbrauch	-	-
CN-PAGE mit Aktivitätsfärbung		
löslicher Extrakt	+	(+)

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Actinobakterielle Hydrogenase (AH) aus *Ralstonia eutropha* erstmals nachgewiesen, isoliert und grundlegend charakterisiert. Die AH ist das erste Enzym aus einer neuen Gruppe von [NiFe]-Hydrogenasen, an dem detaillierte Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Die Charakterisierung der AH konzentrierte sich auf drei Bereiche:

- Die katalytischen Eigenschaften der AH
- Der Aufbau und die molekulare Struktur der AH
- Die physiologische Rolle der AH in *R. eutropha*.

Aus den in allen drei Bereichen gewonnenen Erkenntnissen ergab sich erstmals ein Bild zur Funktion dieser Gruppe 5-Hydrogenase und ihrer molekularen Grundlagen. Die Ergebnisse dieser Arbeit schaffen somit die Grundlagen für weitere Untersuchungen, um die Kenntnisse über die Enzymeigenschaften der AH weiter zu vergrößern.

4.1 Überproduktion und Reinigung der AH

Obwohl das Operon der AH im Genom von *Ralstonia eutropha* bereits seit etwa zehn Jahren bekannt ist (Schwartz *et al.*, 2003), konnte bislang nie eine Aktivität dieser Hydrogenase gefunden werden (Kleihues *et al.*, 2000). Auch Analysen des Proteoms von *R. eutropha* unter verschiedenen Bedingungen lieferten keine Hinweise darauf, dass die AH gebildet wird (Kohlmann *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmals, die Aktivität der AH nachzuweisen.

Unter ihrem nativen Promoter werden die Gene der AH nur sehr schwach exprimiert. Analysen der Transkripte der AH mittels RT-qPCR zeigten, dass die Genexpression der AH unter normalen Bedingungen etwa 20-fach geringer ist als die Genexpression der MBH aus *R. eutropha* (Kapitel 3.2.1). Zudem erwies sich auch die Aktivität der AH als äußerst gering (ausführlicher diskutiert im Kapitel 4.2.1). Aufgrund dieser Tatsachen wurden für die weitere Untersuchung der AH verschiedene Stämme von *R. eutropha* konstruiert, durch die die Menge der produzierten AH gesteigert und die Reinigung des Enzyms aus dem Organismus ermöglicht wurde.

Im einfachsten Expressionssystem wurde der schwache native Promoter des AH-Operons gegen den Promoter der membrangebundenen Hydrogenase (P_{MBH}) aus *R. eutropha* ausgetauscht. Dieser wird bei heterotrophem Wachstum mit Glycerin als Kohlenstoffquelle dereprimiert und gewährleistet hohe Expression der kontrollierten Gene (Schwartz *et al.*, 1998). Die Lage der Gene auf dem Megaplasmid pHG1 sowie die genetische Organisation des AH-Operons wurden durch den Austausch des Promoters nicht verändert (Abbildung 4-1). Durch diese Modifikation wurde im resultierenden Stamm HF864 (P_{MBH} -AH) eine ca. dreifach höhere Expression der AH-Gene im Vergleich zum nativen AH-Operon erzielt. Bei der in

lebenden Zellen gemessenen H_2 -Oxidationsaktivität lag der Unterschied zwischen diesen Stämmen bei etwa sechs. Auch der Unterschied der Aktivität in nativen Gelen liegt etwa in diesem Bereich. Somit konnte zwar eine deutliche Steigerung der Expression und Aktivität erreicht werden, dennoch bleibt die Expression der AH-Gene deutlich niedriger als diejenige der MBH-Gene (Kapitel 3.2.1). Aus dem Stamm HF901 (P_{MBH} -AH_{Strep}), der sich vom Stamm HF864 um ein C-terminal an HofK angebrachtes *Strep*-Affinitätspeptid unterscheidet (Abbildung 4-1), konnte die AH mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 0,7 mg Protein pro 10 g eingesetzter Zellmasse isoliert werden. Diese Isolationen enthielten jedoch in der Regel drei weitere Proteine, die offensichtlich spezifisch an die *Strep*-Tactin-Affinitätsmatrix binden. Diese Proteine wurden bereits in früheren Arbeiten bei der Isolierung löslicher Proteine gefunden und ihre Identität wurde aufgeklärt (Jones *et al.*, 2004). Für die Entfernung dieser Verunreinigungen wurde ein spezielles Protokoll etabliert, mit dem die AH und die verunreinigenden Proteine bei unterschiedlichen pH-Werten getrennt von der Affinitätsmatrix eluiert werden können (Kapitel 3.3.2). Die Ausbeute an bis zur Homogenität gereinigter AH lag nach dieser Methode jedoch nur noch bei ca. 0,3 mg AH pro 10 g Zellen. Daher wurden weitere Systeme zur Überproduktion der AH etabliert.

Für die MBH in *R. eutropha* wurde eine Überproduktion erzielt, indem das gesamte Operon dieser Hydrogenase auf einem gesonderten Plasmid codiert wurde (Lenz *et al.*, 2005). Durch die verglichen zum Megaplasmid höhere Kopienzahl dieses Plasmids lagen die Untereinheiten sowie alle für die Reifung der Hydrogenase benötigten Faktoren in größerer Menge vor, was zu einer etwa um den Faktor 3 erhöhten Aktivität der MBH in isolierten Membranen führte. Mit einem zusätzlich an der kleinen Untereinheit HoxK angebrachten *Strep*-Tag II konnte die MBH aus diesem System durch *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden (Schubert *et al.*, 2007). Auch für die SH existiert ein derartiges Überproduktionssystem. Dieses enthält zusätzlich zum natürlichen Operon der SH Kopien der darin fehlenden *hyp*-Gene und besitzt einen *Strep*-TagII an HoxF (Lauterbach & Lenz, 2013). Es wurde versucht, ein Überproduktionssystem des gesamten Operons auch für die AH zu konstruieren, doch führte dieses Projekt auf Grund der Größe des Operons sowie verschiedener methodischer Probleme nicht zum Erfolg.

Stattdessen wurde ein System zur Überproduktion und Reinigung der AH konstruiert, in dem die Gene der beiden AH-Untereinheiten unter der Kontrolle des SH-Promoters auf einem Plasmid codiert waren. Mit diesem Plasmid wurde ein Stamm komplementiert, der das AH-Operon unter der Kontrolle des MBH-Promoters trug, worin jedoch die große Untereinheit der AH deletiert worden war (Abbildung 4-1). Dieses System wurde gewählt, da zum Einen gezeigt worden war, dass die Gene der SH unter Sauerstofflimitation in erheblichem Maße exprimiert werden (Kapitel 3.2.2.2 und 4.4.1), und dies auch zu hohen Ausbeuten hochaktiven Proteins führt (Lauterbach, 2013). Zum Anderen zeigten die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Daten (ausführlich diskutiert in Kapitel 4.5) dass die AH sowohl durch die im eigenen Operon codierten als auch durch andere Hyp-Proteine maturiert werden kann. In dem resultierenden Stamm HF1035 wurde die AH funktional gebildet, und konnte auf Grund des an HofK angebrachten *Strep*-Tags II mit dem Standard-Protokoll mit guten Ausbeuten von ca. 2 mg pro 10 g Zellen gereinigt werden (Kapitel 3.3.3). Da in diesem Stamm jedoch die kleine Untereinheit auf dem Megaplasmid noch vorhanden ist, konkurriert diese mit der auf dem Plasmid codierten HofK_{Strep}-Untereinheit um die Assemblierung mit der großen Untereinheit HofG. Somit liegt ein Teil der AH ohne die Markierung durch den *Strep*-Tag II vor

und lässt sich demzufolge nicht reinigen. Im Stamm HF1038 ist daher zusätzlich die auf dem Megaplasmid befindliche Kopie von *hofK* deletiert. Die Reinigung der AH aus diesem Stamm war in gleicher Ausbeute und Reinheit wie aus dem Stamm HF1035 möglich. Da sich in einem derartigen System nur die Strukturgene des Enzyms auf einem Plasmid befinden, sind wegen der geringeren Größe der Konstrukte genetische Modifikationen einfacher durchführbar als bei Verwendung des gesamten Operons. Daher wurde ein entsprechendes System auch für die MBH etabliert, in dem ebenfalls aktives Enzym gebildet wird (O. Lenz, persönliche Mitteilung).

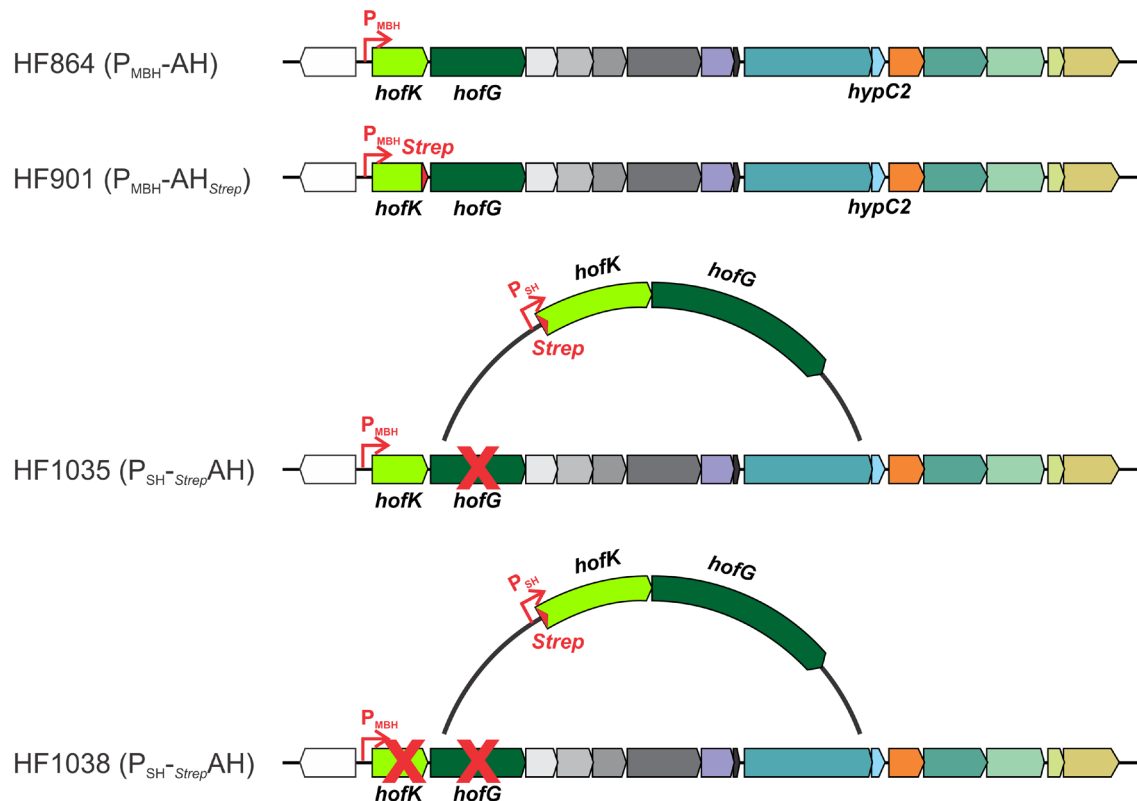


Abbildung 4-1: Stämme von *R. eutropha*, die zur Überproduktion und Reinigung der AH konstruiert wurden. Die auf dem Megaplasmid pHG1 befindlichen Gene des AH-Operons sind in horizontaler Anordnung dargestellt, zusätzliche Plasmide sind durch Halbkreisformen symbolisiert.

In den Reinigungen, die aus den Stämmen HF1035 bzw. HF1038 mit Hilfe des Standard-Protokolls erfolgten, wurde die AH homogen und weitestgehend ohne verunreinigende Proteine isoliert. Die Anwendung des modifizierten Reinigungsprotokolls zur Isolation reiner AH ist hier somit nicht notwendig. Zwei Gründe dürften verantwortlich dafür sein, dass der für die Isolierung der AH verwendete Stamm einen derartigen Einfluss auf die Reinheit des Isolats hat. Zum Einen ist es denkbar, dass durch die größere Menge des gewünschten Enzyms im Stamm HF1035 bzw. HF1038 die Bindekapazität der Affinitätsmatrix besser genutzt wird, und daher weniger Verunreinigungen binden können. Zudem könnte der *Strep*-Tag II am N-Terminus von HofK zu stärkerer Bindung an die Affinitätsmatrix führen als

am C-Terminus. Aus der Röntgenstruktur der AH lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage zu den Zugänglichkeiten des Peptids an beiden Termini ableiten. Beide Termini von HofK liegen in der Struktur relativ frei, wobei die N-terminalen fünf Reste von HofK in der Struktur nicht aufgelöst sind. Diese könnten flexibel sein und als Abstandshalter zum Rest des Proteins dienen. Der C-Terminus ist in der Struktur vollständig vorhanden und kann keine derartige Funktion erfüllen. Allerdings wäre auch denkbar, dass die N-terminalen Reste von HofK nur auf Grund des zur Strukturaufklärung verwendeten *Strep*AH-Proteins keine geordnete Struktur aufweisen, da sie durch den daran fusionierten *Strep*-Tag keine geordnete Position einnehmen können. Es kann angenommen werden, dass sowohl die bessere Ausnutzung der Bindekapazität der Matrix als auch eine möglicherweise bessere Zugänglichkeit des N-terminalen *Strep*-Tags für die bessere Reinheit der AH eine Rolle spielen.

Mit den konstruierten Überproduktionssystemen für die AH konnte ausreichend Enzym für alle bislang durchgeführten Messungen erhalten werden. Dennoch wäre es insbesondere im Hinblick auf weiterführende spektroskopische Untersuchungen wünschenswert, die Proteinausbeute weiter zu steigern. Daher ist es wahrscheinlich weiterhin sinnvoll, das gesamte Operon der AH oder zumindest die Strukturgene mitsamt der unbekannten Gene sowie der Endoprotease von einem Plasmid zu exprimieren.

Im Zuge der Reinigung der AH wurde festgestellt, dass durch die *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie offenbar große Mengen Nukleinsäuren mitgereinigt werden, bei denen es sich vermutlich um RNA-Moleküle handelt (Kapitel 3.3.4). Identische Beobachtungen wurden auch für die SH in *R. eutropha* gemacht (L. Lauterbach, persönliche Mitteilung). Die Nukleinsäuren wurden anhand ihrer Absorption bei 260 nm gefunden und konnten mit entsprechenden Färbereagenzien sichtbar gemacht werden, aber nicht durch Coomassie-Färbung. Es ist unklar, ob sie aufgrund einer unspezifischen Bindung an die AH oder die *Strep*-Tactin-Matrix in den Proben isolierten Enzyms gefunden werden. Die Bindung von RNA an Streptavidin ist bekannt, jedoch handelt es sich hierbei um die Interaktion mit spezifischen Sequenzen, welche auch zur Isolierung von RNA oder Ribonukleoproteinen eingesetzt werden kann (Srisawat & Engelke, 2001; Walker *et al.*, 2008).

Für die Kristallisation von Proteinen müssen diese möglichst sauber isoliert werden, da Verunreinigungen leicht die Ausbildung eines regelmäßigen Kristallgitters stören können (Krauss *et al.*, 2013). Unspezifisch an der AH angelagerte RNA-Moleküle sollten daher entfernt werden. Die Abtrennung der RNA aus der Probe gelang aufgrund der im Vergleich zu Proteinen wesentlich negativeren Ladung durch Anionenaustauschchromatographie als zusätzlichen Reinigungsschritt. Ebenfalls weitgehend von Nukleinsäuren befreite AH wurde auch ohne den zusätzlichen Chromatographieschritt erhalten, indem die Reinigung in Anwesenheit von RNase durchgeführt wurde. Durch die Zugabe von RNase und DNase insbesondere während dem Zellaufschluss konnten alle Nukleinsäuren soweit abgebaut werden, dass sie in der Affinitätschromatographie nicht mehr mitgereinigt wurden, oder spätestens bei der danach erfolgten Ultrafiltration zur Konzentration der Proteinprobe abgetrennt wurden.

4.2 Katalytische Parameter der AH

4.2.1 Katalytische Aktivität der AH

Um die H_2 -Oxidationsaktivität der AH bestimmen zu können wurde ein geeigneter Elektronenakzeptor gesucht. Idealerweise würde für die Aktivitätsbestimmungen der physiologische Akzeptor eingesetzt, wodurch die katalytische Funktion des Enzyms möglichst unverfälscht wiedergegeben werden könnte. Dieser Akzeptor konnte zwar nicht gefunden werden (ausführliche Diskussion in Kapitel 4.4.2), jedoch war die Messung von Aktivitäten der AH mit einer Reihe artifizierlicher Akzeptoren möglich. Die höchste Aktivität wurde dabei mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) bestimmt. Daher wurde als Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität die H_2 :Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Oxidoreduktaseaktivität gemessen. Die Verwendung von NBT als Elektronenakzeptor für Hydrogenasen war in dem Zeitraum, in dem die entsprechenden Experimente stattfanden, noch nicht beschrieben. Zuvor war NBT als Akzeptor für verschiedene Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen bekannt, darunter mehrere NADH- und NADPH-Oxidasen (Liochev *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996; Niraula *et al.*, 2010), sowie eine Pyruvat:Chinon Oxidoreduktase (Schreiner & Eikmanns, 2005). Mittlerweile wurde NBT auch als Elektronenakzeptor der Hydrogenase 1 aus *Escherichia coli* (Hyd 1) beschrieben (Pinske *et al.*, 2012a). Die darin beschriebene Aktivitätsfärbung von Hyd 1 wurde zwar mit NBT und PMS durchgeführt, jedoch wurde die entsprechende Reaktion auch für NBT alleine nachgewiesen. Auch die AH zeigt H_2 :PMS-Oxidoreduktaseaktivität (siehe Tabelle 3-2), jedoch wurde mit NBT als Elektronenakzeptor eine höhere Aktivität gefunden. Die H_2 -abhängige Reduktion von NBT durch die AH konnte zum Einen spektrophotometrisch verfolgt werden, da sich bei der Reduktion von NBT dessen Absorption in einem großen Wellenlängenbereich ändert. Zum Anderen konnte diese Reaktion auch durch Messung der wasserstoffabhängigen Spannung in einer für die Detektion von Wasserstoff modifizierten Clark-Elektrode verfolgt werden.

Die mit NBT bestimmte H_2 -Oxidationsaktivität der AH ist sehr niedrig. Die energiekonservierenden Hydrogenasen SH und MBH in *R. eutropha* besitzen Aktivitäten, die um mehr als zwei Zehnerpotenzen größer sind (Tabelle 4-1). Sogar für die RH, die keine energiekonservierende Funktion erfüllt, wurden höhere Aktivitäten gefunden. Es ist dabei jedoch zu bedenken, dass die Aktivität der AH mit ihrem physiologischen Akzeptor deutlich höher als mit NBT sein könnte. Wenn man davon ausgeht, dass in *R. eutropha* HF864 1 mg AH/ 10 g Zellmasse gebildet werden (Die Reinigung aus dem um einen *Strep*-Tag II modifizierten Stamm HF901 bringt 0,3 mg AH/ 10 g Zellmasse), lässt sich aus dem *in-vivo*- H_2 -Verbrauch des Stammes HF864 eine Aktivität von 8,7 U/ mg AH abschätzen. Diese grob überschlagene Rechnung zeigt, dass mit dem physiologischen Akzeptor eine deutlich höhere Aktivität als mit NBT erwartet werden kann. Jedoch scheint auch diese Aktivität der AH nicht auszureichen, um autotrophes Wachstum von *R. eutropha* zu ermöglichen. Somit kann die AH offenbar höchstens einen eingeschränkten Erhaltungsstoffwechsel mit Energie versorgen. Denkbar wäre auch, dass die AH auch in diesem Fall nur eine von mehreren Reaktionen katalysiert, die den Organismus mit Energie versorgen.

Viele Hydrogenasen werden bei der Reinigung aus dem Organismus in inaktiver Form erhalten und müssen durch Reduktion aktiviert werden (Schneider & Schlegel, 1976; Schneider *et al.*, 1984; Fernandez *et al.*, 1985). Im Gegensatz dazu ist dieser Schritt bei der

AH nicht notwendig. Die Aktivität der AH kann im Zustand, der bei der Reinigung erhalten wird, sofort gemessen werden. Somit liegt das aktive Zentrum der AH auch bei aerober Reinigung in einer katalytisch aktiven oder zumindest sich sehr schnell selbst reaktivierenden Form vor (ausführliche Diskussion in Kapitel 4.3.2).

Tabelle 4-1. Vergleich der kinetischen Parameter der vier Hydrogenasen aus *R. eutropha*.

	Spezifische Aktivität* [U mg ⁻¹]	K _M ^{H₂*} [μM]	k _{cat} * [s ⁻¹]	Referenzen
SH	137	11	384	Lauterbach <i>et al.</i> , 2013; Schneider & Schlegel, 1976
MBH	140	6,1	237	Goris <i>et al.</i> , 2011; Ludwig <i>et al.</i> , 2009a
RH	1,2	25	1,8	Bernhard <i>et al.</i> , 2001
AH	0,28±0,02	3,6±0,5	0,5	diese Arbeit

* Es ist zu beachten, dass die in der Tabelle präsentierten kinetischen Parameter mit unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden, und daher nur eingeschränkt vergleichbar sind. Alle Werte wurden an isoliertem Enzym bestimmt.

4.2.2 Affinität der AH zu Wasserstoff

Für eine Reihe von Gruppe 5-Hydrogenasen aus unterschiedlichen *Streptomyces*-Stämmen wurde bei *in-vivo*-Messungen eine sehr hohe Affinität zu Wasserstoff beobachtet (Constant *et al.*, 2010). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um ein charakteristisches Merkmal der Gruppe 5-Hydrogenasen handelt (Constant *et al.*, 2011b). Obwohl die AH eindeutig eine [NiFe]-Hydrogenase der Gruppe 5 ist, zeigt sie sowohl *in vivo* als auch im gereinigten Zustand nicht die hohe Affinität der Hydrogenasen aus *Streptomyces*-Spezies. An isoliertem Enzym wurde eine Michaelis-Konstante für H₂ von 3,6 μM bestimmt, die Bestimmung an lebenden Zellen ergab einen Wert von 0,76 μM. Damit ist die AH in *R. eutropha* zwar die Hydrogenase mit der höchsten Affinität zu H₂ (vgl. Tabelle 4-1), besitzt aber nicht die sehr hohe H₂-Affinität der *Streptomyces*-Stämme. Diese Resultate stehen im Einklang mit früheren Studien, in denen keine hochaffine H₂-Aufnahme von *R. eutropha* identifiziert wurde (Conrad *et al.*, 1983). Die Abweichung der beiden für die AH bestimmten Werte dürfte in erster Linie auf die unterschiedlichen Testsysteme zurückzuführen sein. In ihrer physiologischen Umgebung steht der AH beispielsweise der noch unbekannte physiologische Elektronenakzeptor zur Verfügung, während die Elektronen vom isolierten Enzym auf den artifiziellen Akzeptor NBT übertragen werden. Die Affinität, die in lebenden Zellen bestimmt wurde, liegt an der unteren Grenze dessen, was von Constant *et al.*, 2010, als „geringe Affinität“ beschrieben wurde. Die AH, und damit auch *R. eutropha*, ist somit nicht an der Oxidation atmosphärischen Wasserstoffs in Böden beteiligt. Bereits in früheren Studien wurde angemerkt, dass nicht alle Organismen, die Gruppe 5-Hydrogenasen codieren, an der Oxidation von H₂ in atmosphärischen Konzentrationen beteiligt sein können (Constant *et al.*, 2011b). Die Kopienzahl der Gene von Gruppe 5-Hydrogenasen in Böden übersteigt den Untersuchungen zufolge die aus der H₂-Oxidationsaktivität der Böden berechnete Zahl beteiligter Organismen. Dieses Resultat wurde mit dem Vorkommen inaktiver Gruppe 5-

Hydrogenasen begründet. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss hierbei auch das Vorkommen nicht hochaffiner Gruppe 5-Hydrogenasen berücksichtigt werden. Ob und in welchem Ausmaß neben der AH aus *R. eutropha* auch andere Gruppe 5-Hydrogenasen aktiv aber nicht hochaffin sind, ist ein interessanter Gegenstand für zukünftige Untersuchungen.

Die MBH aus *R. eutropha* zeigte bei Verringerung der Temperatur zunehmende Affinität zu Wasserstoff (Cracknell *et al.*, 2009). Bei 10 °C wurde hier eine Affinität von 0,4 µM H₂ bestimmt, was schon näher an den Werten der hochaffinen Hydrogenasen liegt. Wäre der K_M-Wert der H₂-Oxidation in der AH in ähnlichem Maße von der Temperatur abhängig, könnte die hochaffine H₂-Aufnahme durch die AH doch möglich sein, da *R. eutropha* aus Böden isoliert wurde, deren mittlere Temperatur vermutlich deutlich unter 20 °C liegt (Wilde, 1962). Im Gegensatz zur MBH wurde für die AH jedoch bei 15 °C eine gegenüber 30 °C etwas verringerte Affinität bestimmt. Eventuell könnte die AH somit bei höheren Temperaturen als 30 °C höhere Affinität zu H₂ zeigen. Um hierzu eine Aussage zu ermöglichen, müssten zusätzliche Untersuchungen angestellt werden.

4.2.3 Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Aktivität der AH

Für die biochemische Charakterisierung der AH wurde auch der Einfluss der Temperatur sowie des pH-Wertes auf die Aktivität untersucht. In beiden Fällen wurden bemerkenswerte Ergebnisse erhalten (Kapitel 3.6.4 und 3.6.5).

Die AH zeigt die höchsten Aktivitäten bei hohen Temperaturen. Das Optimum der Temperatur konnte allerdings nicht bestimmt werden, da die Messungen aufgrund technischer Einschränkungen nicht oberhalb von 80 °C durchgeführt werden konnten. Die höchste Aktivität der AH wurde bei dieser Temperatur bestimmt. Bei dieser Temperatur ist das Enzym noch leidlich stabil; es wurde eine Halbwertszeit der Aktivität von 3,5 min bestimmt. Zuvor wurden bereits andere Hydrogenasen aus mesophilen Organismen beschrieben, die bei derartigen Temperaturen noch Katalyse betreiben können. Für die Hyd-Hydrogenase aus *Thiocapsa roseopersicina* BBS wurde ein Temperaturoptimum von 70 °C und Stabilität des Enzyms bis ca. 80 °C gefunden (Gogotov *et al.*, 1978). Jedoch ist diese Eigenschaft keineswegs üblich für Hydrogenasen. Beispielsweise beträgt das Temperaturoptimum der SH aus *R. eutropha* 33 °C (Schneider & Schlegel, 1976). In Böden wurde für die hochaffine H₂-Aufnahme ein Temperaturoptimum von 35-40 °C bestimmt, für die H₂-Oxidation mit geringerer Affinität jedoch ein Optimum von 50-60 °C (Schuler & Conrad, 1991). Das hohe Temperaturoptimum und die Stabilität der AH bei hohen Temperaturen hat somit unter den üblichen physiologischen Bedingungen in *R. eutropha* keine Relevanz, kann aber unter extremen Bedingungen vorteilhaft sein. Für die Gruppe 5-Hydrogenase aus *Streptomyces str.* PCB7 wurde gezeigt, dass sie offenbar ausschließlich in Sporen gebildet wird, welche als Überlebensform ein gewisses Maß an Thermostabilität besitzen (Constant *et al.*, 2008). Die Struktur der AH, in der offenbar zwei jeweils aus HofK und HofG bestehende Monomere ein stabiles Dimer bilden, dürfte durch ihre hohe Stabilität zumindest mitverantwortlich dafür sein, dass die AH zur Katalyse bei diesen hohen Temperaturen befähigt ist.

Die Abhängigkeit der Aktivität der AH vom pH-Wert wurde spektrophotometrisch mit NBT als Elektronenakzeptor bestimmt, wobei die höchste Aktivität bei pH 11 gefunden wurde.

Oberhalb von pH 11 wurde der rasche Zerfall des Enzyms beobachtet. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass das gefundene Optimum der Aktivität bei pH 11 dem physiologischen Zustand entspricht. Dieser Befund ist vermutlich weitgehend auf den Akzeptor NBT zurückzuführen, und dürfte für die Reaktion der AH mit ihrem nativen Elektronenakzeptor nicht beobachtet werden. Hierfür spricht, dass auch für die Reaktion der RH mit NBT bei pH 11 eine 1,6-fach höhere Aktivität als bei pH 8 beobachtet wurde (Kapitel 3.6.5), während mit Methylenblau zwischen pH 5 und pH 10 keine nennenswerte Änderung der Aktivität der RH gefunden wurde (Bernhard *et al.*, 2001). Jedoch konnte die physiologische Aktivität der AH im alkalischen pH-Bereich mangels eines geeigneten Elektronenakzeptors nicht ermittelt werden. Die Daten zeigen jedoch, dass die AH bis pH 11 stabil und katalytisch aktiv ist. Falls in zukünftigen Untersuchungen der native oder zumindest ein besser geeigneter Elektronenakzeptor identifiziert wird, wäre eine erneute Bestimmung des pH-Optimums sinnvoll.

4.3 Struktur und Cofaktorzusammensetzung der AH und deren möglicher Einfluss auf die Sauerstofftoleranz

4.3.1 Physiologische Relevanz der Dimerisierung

Die AH wird überwiegend in einer dimeren Form gefunden, in der die minimale funktionale Einheit aus HofK und HofG zweimal vorkommt. Dimere und Trimere der funktionellen Einheit wurden für viele [NiFe]-Hydrogenasen beschrieben (Ogata *et al.*, 2010; Frielingsdorf *et al.*, 2011; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012). Eine physiologische Rolle dieser Oligomere wird vermutet (Frielingsdorf *et al.*, 2011; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2013b). Die regulatorische Hydrogenase aus *R. eutropha* kommt in ihrer physiologischen Form ebenfalls als Dimer (HoxBC)₂ vor (Bernhard *et al.*, 2001). Im Falle der AH könnte das Dimer gleichfalls physiologisch relevant sein (siehe Kapitel 3.5.2). Die kleine Untereinheit der AH besitzt eine kurze N-terminale sowie eine lange C-terminale Extension. Diese Extensionen ragen jeweils weit aus der globulären Kernstruktur des AH-Monomers heraus und bilden große Interaktionsflächen für den Kontakt zum zweiten AH-Monomer in der Dimerstruktur. Im Gegensatz zu fast allen bislang bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen mit Ausnahme der Hydrogenase 1 aus *E. coli* (Volbeda *et al.*, 2013b) nimmt der C-Terminus der kleinen Untereinheiten der AH eine geordnete Struktur ein, die in der Kristallstruktur sichtbar ist. Die C-Termini beider HofK-Untereinheiten bilden lange α -Helices, die parallel zueinander liegen. Diese Helices und die kurze N-terminale Extension von HofK sind die entscheidenden Kontaktflächen für eine stabile Dimerisierung der AH. Die umfangreichen Interaktionen im Dimer könnten auch ausschlaggebend für die Stabilität bei hohen Temperaturen und hohen pH-Werten sein (Kapitel 4.2.3).

In der Gruppe der membrangebundenen Hydrogenasen, zu der die bislang bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen überwiegend zählen, liegt am C-Terminus der kleinen Untereinheit ein Polypeptid, welches diese Enzyme an ein membranintegrales Cytochrom *b* und somit an die Cytoplasmamembran verankert. Dieses membranständige Cytochrom *b* ist gleichzeitig der physiologische Elektronenakzeptor (Bernhard *et al.*, 1996; Bernhard *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998). In den Strukturen, welche ausschließlich das Monomer aus großer

und kleiner Untereinheit umfassen, ist dieses Polypeptid nicht sichtbar und nimmt somit offenbar keine geordnete Struktur ein (Volbeda *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 2010; Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012). In Anwesenheit des Cytochrom *b* wurde jedoch ein hoch geordneter C-Terminus gefunden, der eine lange α -Helix als Kontaktfläche ausbildet (Volbeda *et al.*, 2013b). In regulatorischen Hydrogenasen wird der C-Terminus der kleinen Untereinheiten benötigt, um einen zur Regulation befähigten Komplex mit der dazu gehörigen Histidin-Proteinkinase auszubilden (Buhrke *et al.*, 2004). Ohne diesen Bereich findet nicht nur keine Komplexbildung mit der Proteinkinase statt, sondern es unterbleibt auch die Dimerisierung der Hydrogenase-Monomere HoxBC. Der C-Terminus der kleinen Untereinheit hat somit offenbar in verschiedenen Gruppen der [NiFe]-Hydrogenasen die Aufgabe, eine Bindefläche zu anderen Proteinen bereitzustellen.

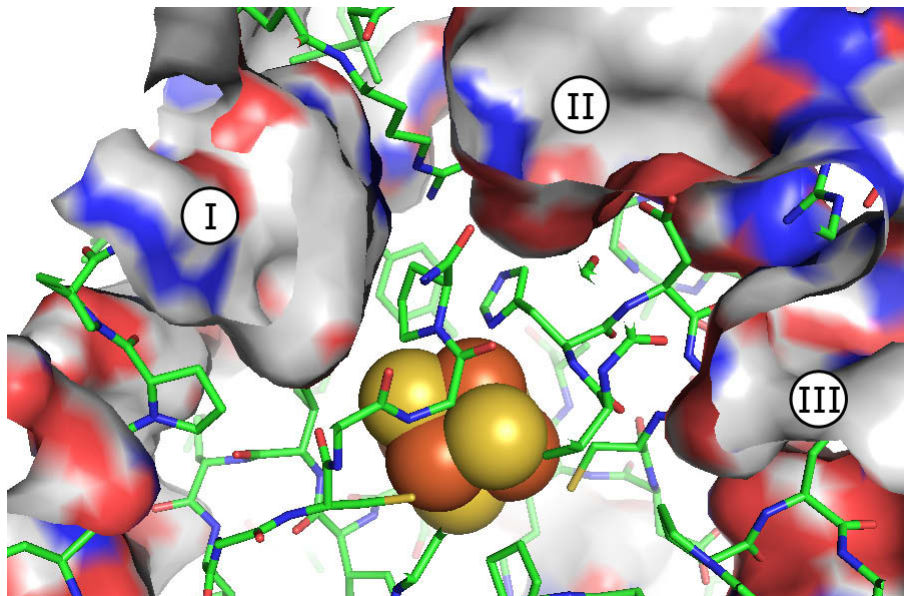


Abbildung 4-2: Taschen in der Oberfläche der AH in der Umgebung des distalen [FeS]-Clusters. An den Oberflächen entspricht rote und blaue Farbgebung polaren Bereichen; weiße Bereiche sind unpolar. Die polaren und unpolaren Bereiche sind in den Taschen wie auf der gesamten Oberfläche recht gleichmäßig vertreten. Der distale [FeS]-Cluster ist durch Sphären dargestellt, die relevanten Aminosäureketten sind als grüne „Sticks“ repräsentiert. Die Bindetaschen sind mit den Ziffern I, II und III nummeriert.

In der Struktur der AH verdecken die parallelen Helices der C-Termini der beiden HofK-Untereinheiten die distalen [FeS]-Cluster, und damit den Ort der Elektronenübertragung auf den physiologischen Elektronenakzeptor. Die Oberfläche der Helices liegt vom distalen [FeS]-Cluster aus außerhalb der Reichweite des physiologischen Elektronentransfers (Page *et al.*, 1999). Jedoch gibt es drei Taschen unterschiedlicher Größe, in denen die Distanz des distalen [FeS]-Clusters zur Proteinoberfläche maximal 8 Å beträgt (Abbildung 4-2). Während die Taschen I und III so eng sind, dass bestenfalls kleine, lösliche Elektronenakzeptoren hineingelangen können, ist die Tasche II von größerem Ausmaß und liegt zudem direkt oberhalb des [FeS]-Cluster koordinierenden Histidins, dem eine Rolle bei der Elektronenübertragung auf den Akzeptor zugeschrieben wird (Dementin *et al.*, 2006). Diese Tasche könnte somit eine Bindestelle für einen größeren Elektronenakzeptor darstellen. Der

bislang am besten geeignete artifizielle Elektronenakzeptor NBT passt gut in diese Tasche, sodass ein Elektronentransfer innerhalb der biologischen Reichweite möglich ist (Page *et al.*, 1999). Falls der physiologische Akzeptor ein Protein ist, müsste es von der Form her an die Tasche angepasst sein, damit die Distanz der Elektronenübertragung nicht zu groß wird. Es wurde bereits zuvor vermutet, dass eines der in den Operons von Gruppe 5-Hydrogenasen codierten konservierten unbekannten Proteine der physiologische Elektronenakzeptor ist (Constant *et al.*, 2011b; ausführlicher diskutiert in Kapitel 4.4.2). Es wäre außerdem denkbar, dass bei der Bindung des physiologischen Elektronenakzeptors eine Konformationsänderung eine Rolle spielt. Diese Möglichkeit kann mit der vorliegenden Struktur nicht beurteilt werden. Für die Bindung anderer Akzeptoren als dem physiologischen könnte die Tasche jedoch eher ungeeignet sein und nur eine schlechte Interaktion zulassen, woraus die extrem geringe Aktivität resultieren könnte. Entsprechendes wird auch für die RH aus *R. eutropha* vermutet (Ganskow, 2012).

Da es unwahrscheinlich ist, dass die C-terminale Extension von HofK auch in der monomeren AH eine derart geordnete Struktur wie im Dimer einnimmt, könnte durch Bildung beziehungsweise Zerfall des Dimers auch die Wechselwirkung mit einem Elektronenakzeptor verändert werden. Bei einer anderen, möglicherweise ungeordneten Struktur der C-terminalen Extension in der monomeren Form könnte der distale [FeS]-Cluster der AH besser zugänglich für ein elektronenakzeptierendes Protein sein. Um dieser Hypothese nachzugehen könnte eine Variante der AH konstruiert werden, in welcher die C-terminale Extension von HofK deletiert ist. Eine derartige Variante dürfte zum Einen wahrscheinlich als Monomer vorliegen. Zum Anderen kann eine andere Spezifität gegenüber möglichen Elektronenakzeptoren erwartet werden, die auf der vermutlich besseren Zugänglichkeit des distalen [FeS]-Clusters beruht. Auch ein Elektronentransfer von der AH auf eine Elektrode zum Zweck von elektrochemischen Untersuchungen könnte durch diese Proteinvariante erleichtert werden.

Die Dimerisierung der AH könnte weitere weitreichende Auswirkungen auf die Funktion der AH haben. Im Dimer liegen die beiden distalen [4Fe4S]-Cluster in der Reichweite des physiologischen Elektronentransports (Page *et al.*, 1999). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Elektronentransportketten der beiden AH-Monomere miteinander interagieren. Diese Interaktion könnte auch Auswirkungen auf die Zustände am [NiFe]-Zentrum haben (diskutiert in Kapitel 4.3.2). Ähnliche Anordnungen der Elektronentransportketten wurden auch bei den Strukturen der membrangebundenen sauerstofftoleranten Hydrogenasen aus *Hydrogenovibrio marinus* und *E. coli* gefunden (Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012). Auch hier wurde die Vermutung geäußert, dass diese Anordnung physiologisch relevant sein dürfte. Eventuell besitzt die mögliche Kopplung der Elektronentransportketten im AH-Dimer eine Rolle bei der Sauerstofftoleranz der Enzyme, was im Kapitel 4.3.5 genauer erläutert wird. Hierbei wäre es denkbar, dass ein inaktives Monomer der AH durch das andere, aktive Monomer eines Dimers durch schnelle Elektronenübertragung reaktiviert wird. Eine Reaktivierung via Elektronentransfer von einem aktiven auf ein inaktives Hydrogenase-Monomer wurde für die Hydrogenase 1 aus *E. coli* in elektrochemischen Experimenten beobachtet (Wait *et al.*, 2010). Gleiches wird auch für die MBH aus *R. eutropha* vermutet (Frielingsdorf *et al.*, 2011). Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die dimere Form die physiologisch relevante Form der AH ist.

4.3.2 Das [NiFe]-Zentrum und der katalytische Zyklus

Die Kristallstruktur der AH offenbarte ein [NiFe]-Zentrum, das sich in seinem Aufbau offenbar nicht von den [NiFe]-Zentren anderer Hydrogenasen unterscheidet. In der zweiten Koordinationssphäre des [NiFe]-Zentrums sind gegenüber der MBH aus *R. eutropha* drei Aminosäuren verändert (siehe Abbildung 3-29). Zum Einen findet sich in der AH ein Prolin an der Position eines Valins der MBH, sowie die entgegengesetzte Veränderung an einer benachbarten Position. Zum Anderen ersetzt in der AH ein Asparagin ein in der MBH gefundenes nicht koordinierendes Cystein. In sauerstoffsensitiven [NiFe]-Hydrogenasen ist diese Position in der Regel durch Alanin, Valin oder Threonin besetzt. Der Austausch des in der MBH vorkommenden Cysteins gegen eine dieser Aminosäuren hatte insbesondere im Fall von Alanin eine drastisch verringerte Affinität zu Wasserstoff zur Folge (Ludwig *et al.*, 2009a). Diese Position liegt in unmittelbarer Umgebung des CO-Liganden und könnte somit die Elektronendichte am Fe-Atom beeinflussen. Generell können durch eine Veränderte Koordinationssphäre des [NiFe]-Zentrums sowohl die Elektronendichten an den Metallatomen als auch die Geometrie des Zentrums verändert werden. Es kann aber bislang nicht beurteilt werden, inwiefern das [NiFe]-Zentrum der AH durch die gefundenen Unterschiede der Koordinationssphäre beeinflusst wird. Gerade in den spektroskopischen Eigenschaften der AH offenbaren sich jedoch am aktiven Zentrum einige Unterschiede zu Standard-Hydrogenasen und Hydrogenasen des MBH-Typs, insbesondere im Verhalten in Gegenwart von Sauerstoff und den im katalytischen Zyklus auftretenden Zuständen.

Das Verhalten der Hydrogenasen in Gegenwart von Sauerstoff korreliert mit den Zuständen des aktiven [NiFe]-Zentrums, die im katalytischen Zyklus der jeweiligen Vertreter auftreten (De Lacey *et al.*, 2007; Pandelia *et al.*, 2010). Der langsam reaktivierbare Ni_u-A-Zustand sauerstoffempfindlicher Hydrogenasen, in dem eine Peroxo-Gruppe oder ein ähnlicher Ligand an der freien Koordinationsstelle zwischen Ni- und Fe-Atom bindet, wird bei sauerstofftoleranten Enzymen nicht beobachtet. Hier kommt im oxidierten Enzym lediglich ein Ni_r-B-Zustand vor, der schnell reaktiviert werden kann (De Lacey *et al.*, 2007; Fritsch *et al.*, 2013). In [NiFeSe]-Hydrogenasen konnten weder Ni_u-A- noch Ni_r-B-Zustände detektiert werden (Riethausen *et al.*, 2013). Als Erklärung hierfür wird angenommen, dass das anstelle eines normalen Cysteins am aktiven Zentrum vorkommende Selenocystein leichter als ein Cystein durch Sauerstoff oxidiert wird und diesen dabei von der Bindestelle für H₂ fernhält (Volbeda *et al.*, 2013a). Eine sehr aufschlussreiche Methode für die Untersuchung des Redoxverhaltens des aktiven Zentrums ist die Infrarot-(IR)-Spektroskopie und die Anwendung derselben an Proben, deren Potential elektrochemisch eingestellt wird (IR-Spektroelektrochemie). Bei diesen Methoden werden die Zustände anhand spezifischer Wellenzahlen der Liganden des [NiFe]-Zentrums unterschieden (Best, 2005).

Im Fall der AH wurden je nach Präparation mittels FTIR-Spektroskopie unterschiedliche Zustände gefunden. In einigen Präparationen wurden genau ein oxidiertes und ein reduzierter Zustand gefunden (Kapitel 3.7.2), andere Präparationen hingegen zeigten je zwei oxidierte und reduzierte Zustände sowie einen intermediären Zustand. Die Zustände in letzteren Präparationen sind wahrscheinlich auf zwei unterschiedliche Spezies A und B zurückzuführen. Im spektroelektrochemischen Experiment wurde eine Interkonversion dieser beiden Spezies beobachtet. Zu Beginn des Experiments lag hauptsächlich ein Zustand mit einer CO-Bande bei 1942 cm⁻¹ vor, während nach Reduktion und folgender Reoxidation der

Probe überwiegend ein Zustand mit einer CO-Bande bei 1934 cm^{-1} gefunden wurde. Bei den Spezies A und B handelt es sich möglicherweise um die monomere und die dimere Form der AH, da diese in den meisten, aber nicht allen Proben nebeneinander auftraten. Die physiologische Relevanz des AH-Dimers wurde in Kapitel 4.3.1 diskutiert. Die auf Grund der strukturellen Nähe der distalen [FeS]-Cluster angenommene Interaktion der Elektronentransportketten im Dimer könnte zu einer gegenüber der monomeren AH veränderten elektronischen Situation führen. Damit wäre eine Verschiebung der Wellenzahlen der CO- und CN-Liganden am [NiFe]-Zentrum zu erklären. Durch die gleichzeitige Anwesenheit der monomeren und dimeren Form träten die Signale beider Spezies auf, sodass jeweils zwei oxidierte und zwei reduzierte Zustände vorkommen. Die Präparationen, die nur jeweils einen Zustand zeigen, dürften demzufolge nur eine der beiden Spezies beinhalten. In zukünftigen Studien könnte hierzu eine AH-Variante konstruiert werden, der entsprechend der RH_{Stop} -Variante (Buhrke *et al.*, 2004) der C-terminale Bereich fehlt. Die Charakterisierung dieser AH-Variante, insbesondere im Hinblick auf Dimerisierungsverhalten und spektroskopische Eigenschaften, sollte mehr Klarheit darüber schaffen, ob die Interaktion im Dimer tatsächlich einen Einfluss auf die spektroskopisch beobachteten Zustände hat.

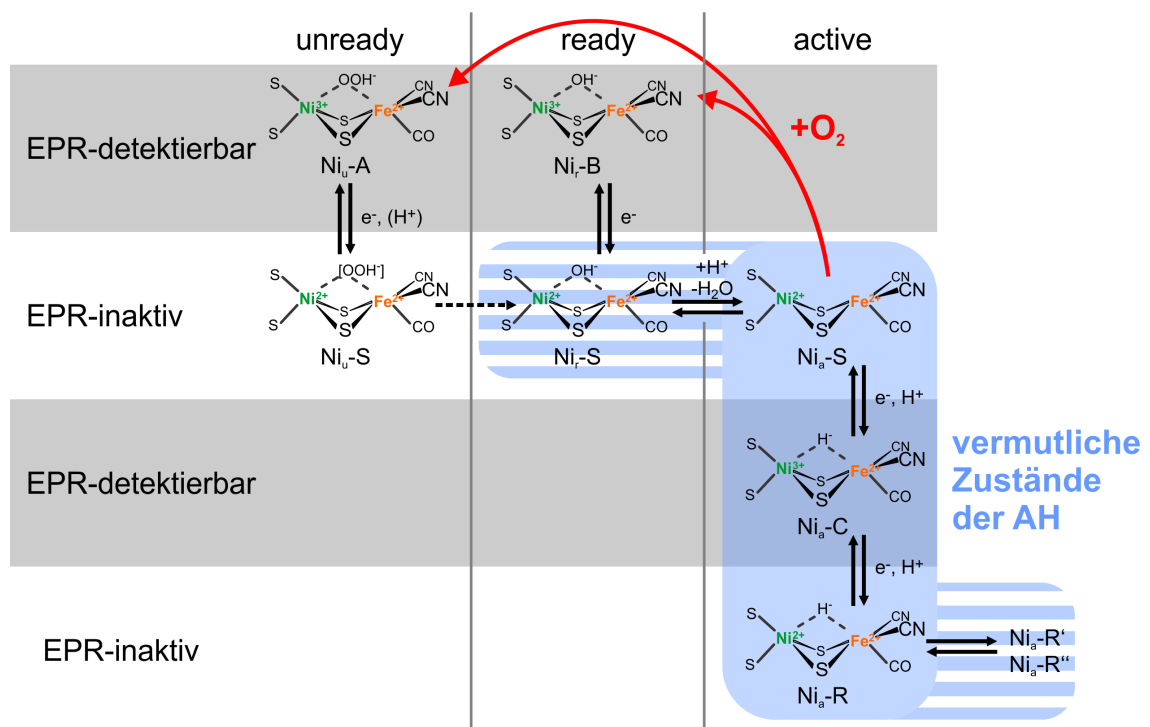


Abbildung 4-3: Zustände und Übergänge am aktiven Zentrum in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen. Die Zustände sind gemäß ihrer Reaktivierbarkeit als „unready“, „ready“ oder „active“ und gemäß ihrer Sichtbarkeit in der EPR-Spektroskopie als „EPR-detektierbar“ oder „EPR-inaktiv“ eingeordnet. EPR-aktive Zustände beinhalten ein Ni(III), EPR-inaktive Zustände ein Ni(II). Die durch Sauerstoff induzierten Übergänge sind rot dargestellt. Die vermutlich in der AH vorkommenden Zustände sind blau unterlegt. Zustände, deren Vorkommen in der AH noch nicht beurteilt werden kann sind mit blauen Streifen unterlegt. Das Vorkommen von $\text{Ni}_a\text{-C}$ in der AH ist durch EPR-Spektroskopie noch nicht nachgewiesen. Die Abbildung wurde modifiziert aus Ogata *et al.*, 2009, und Pandelia *et al.*, 2010, übernommen.

Mittels FTIR-Spektroskopie und Spektroelektrochemie wurden in der AH ausschließlich aktive oder schnell reaktivierbare Zustände gefunden. In der EPR-Spektroskopie wurden weder in oxidierten noch in durch H_2 reduzierten Proben Signale der AH identifiziert. Damit ist eine sichere Zuordnung der Zustände sowie keine Aussage über die jeweils an der katalytischen Bindestelle gebundenen Spezies nur schwer möglich. Da die oxidierten Zustände jedoch leicht reaktivierbar sind und frisch isoliertes AH-Protein nicht über längere Zeit reduktiv reaktiviert werden muss (Lag-Phase), scheint kein Ni_u -A-artiger Zustand aufzutreten. Die bislang verfügbaren Daten deuten auf einen katalytischen Zyklus hin, in dem ausschließlich aktive Zustände auftreten (Abbildung 4-3). Für die oxidierten Zustände traten Signale bei 1942, 2099 und 2107 cm^{-1} beziehungsweise bei 1934, 2086 und 2094 cm^{-1} auf. Der erste Zustand ähnelt in seiner CO-Schwingungsfrequenz dem Ni_a -S-Zustand der RH aus *R. eutropha* (1943, 2073 und 2081 cm^{-1} ; Pierik *et al.*, 1998), für die hohen CN-Schwingungsfrequenzen dieses Zustandes gibt es jedoch in Standard-Hydrogenasen und denjenigen aus *R. eutropha* keine Entsprechung. Der zweite oxidierte Zustand ähnelt am ehesten dem Ni_a -S-Zustand der MBH aus *R. eutropha* (1936, 2075 und 2093 cm^{-1} ; Saggu *et al.*, 2009), wobei auch hier keine genaue Übereinstimmung der CN-Banden vorliegt. Die entsprechenden Zustände von Standard-Hydrogenasen liegen bei noch niedrigeren Wellenzahlen (De Lacey *et al.*, 1997; Bleijlevens *et al.*, 2004; Fichtner *et al.*, 2006). Die reduzierten Zustände der AH liegen bei 1929, 2072 und 2086 cm^{-1} bzw. 1944 und 2094 cm^{-1} . In letzterem Zustand konnte nur eine CN-Bande zugeordnet werden. Die CO-Banden dieser Zustände liegen in dem Bereich, in dem die Ni_a -R'- bzw. Ni_a -R-Zustände der meisten [NiFe]-Hydrogenasen gefunden werden (De Lacey *et al.*, 1997; Bleijlevens *et al.*, 2004; Fichtner *et al.*, 2006; Saggu *et al.*, 2009). Auch hier zeigt sich eine deutliche Verschiebung der CN-Zustände der AH zu höheren Wellenzahlen. Ein intermediärer Zustand mit Wellenzahlen bei 1957, 1972 und 1986 cm^{-1} wurde im Rahmen der spektroelektrochemischen Untersuchungen im Potentialbereich zwischen -300 mV und -400 mV identifiziert. Die Wellenzahlen der CO- und CN-Banden dieses Zustandes stimmen gut mit den Ni_a -C-Signalen verschiedener Hydrogenasen überein, z. B. denjenigen aus *Desulfovibrio gigas* (1952, 2073 und 2086 cm^{-1} ; De Lacey *et al.*, 1997) oder *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (1961, 2074, 2085 cm^{-1} ; Fichtner *et al.*, 2006). Da unter diesen Bedingungen bisher keine EPR-Spektroskopie durchgeführt wurde, ist nicht sicher, ob es sich um Ni_a -C oder einen anderen Zustand handelt. Falls sich der vorläufige katalytische Zyklus bewahrheitet, kämen darin keine Zustände vor, in denen eine Sauerstoffspezies am aktiven Zentrum gebunden ist. Daher kann mit dem derzeitigen Kenntnisstand nicht beurteilt werden, in welcher Weise Sauerstoff am [NiFe]-Zentrum angreift und ob überhaupt ein Angriff von Sauerstoff stattfindet. Das Fehlen von Zuständen mit Sauerstoff am [NiFe]-Zentrum wurde auch für die RH aus *R. eutropha* beobachtet. Hier wurde vermutet, dass der Gaskanal durch voluminöse Aminosäuren derart verengt wird, dass Sauerstoff nicht ans aktive Zentrum gelangen kann (Buhrke *et al.*, 2005). Einer aktuellen Publikation zufolge wurden Hinweise darauf gefunden, dass die inaktiven Zustände des [NiFe]-Zentrums auch ohne molekularen Sauerstoff gebildet werden könnten und dieser daher nicht notwendigerweise am [NiFe]-Zentrum angreifen muss (Abou Hamdan *et al.*, 2013). Generell sind weitere Bemühungen sehr erstrebenswert, den katalytischen Zyklus der AH und die Rolle der Dimerisierung darin detaillierter aufzuklären. Ein Ziel hierbei sollte die Identifizierung des Ni_a -C-Zustandes mittels EPR-Spektroskopie sein. Zudem wäre es sehr erstrebenswert, die AH durch die bislang nicht geglückte Immobilisierung auf einer Elektrode elektrochemischen Untersuchungen zugänglich zu machen.

4.3.3 Die Elektronentransportkette der AH

In der AH werden die durch Oxidation von H_2 am [NiFe]-Zentrum gewonnenen Elektronen über eine Elektronentransportkette, die einen proximalen $Cys_3Asp[4Fe4S]$ -Cluster, einen medialen $Cys_4[4Fe4S]$ -Cluster und einen distalen $Cys_3His[4Fe4S]$ -Cluster umfasst, auf einen externen Elektronenakzeptor übertragen. Bemerkenswert sind dabei der proximale und der mediale [FeS]-Cluster, die sich von den Clustern in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen und in sauerstofftoleranten Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen unterscheiden. Am proximalen [FeS]-Cluster der AH ist eines der vier Cysteine, die die klassische Kubanstruktur eines [4Fe4S]-Clusters koordinieren, durch ein Aspartat ausgetauscht. Der proximale Cluster besitzt somit drei Cystein- und einen Aspartatliganden. Die Ligation von [FeS]-Clustern durch Aspartat wurde schon für verschiedene Enzyme beschrieben (George *et al.*, 1989; Calzolari *et al.*, 1995; Muraki *et al.*, 2010; Gruner *et al.*, 2011), jedoch bislang nur für eine andere Hydrogenase (Mills *et al.*, 2013). Es handelt sich hierbei um [4Fe4S]-Cluster, wobei im Fall einiger Ferredoxine ein [3Fe4S]-Cluster isoliert wird, der sich leicht zum [4Fe4S]-Cluster rekonstituieren lässt (George *et al.*, 1989). In der AH wird ebenfalls ein [4Fe4S]-Cluster koordiniert, wobei eine denkbare Änderung der Geometrie gegenüber der Koordination durch vier Cysteine in der Kristallstruktur nicht zu erkennen ist.

Auch in sauerstofftoleranten Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen wie der MBH aus *R. eutropha* wurde ein ungewöhnlicher proximaler [FeS]-Cluster gefunden, der eine wichtige Determinante der Sauerstofftoleranz dieser Enzyme ist (Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012). Hierbei handelt es sich um einen durch sechs Cysteine koordinierten [4Fe3S]-Cluster. Dieser Cluster ermöglicht im Gegensatz zu geschlossenen [4Fe4S]-Clustern aufgrund seiner offenen Struktur einen superoxidierten Redoxzustand mit hohem Potential (Pandelia *et al.*, 2011). Die Möglichkeit des proximalen Clusters, diesen Redoxzustand einzunehmen, stellt zusätzliche Elektronen bereit, mit deren Hilfe am [NiFe]-Zentrum angreifender Sauerstoff sofort zu H_2O und einem Hydroxo-Liganden reduziert werden kann (Fritsch *et al.*, 2011b). Der schwer reaktivierbare Ni_u -A-Zustand wird unter Anderem hierdurch verhindert. Das [NiFe]-Zentrum unterscheidet sich dabei nicht offensichtlich von sauerstoffempfindlichen Enzymen (Fritsch *et al.*, 2011b; Volbeda *et al.*, 2012).

Ein superoxidierte Redoxzustand des proximalen [FeS]-Clusters ist in der AH wahrscheinlich nicht möglich. Zwar wurde in der [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* eine superoxidierte [4Fe3S3O]-Form des proximalen [4Fe4S]-Clusters gefunden, jedoch handelt es sich hierbei um eine Schädigung durch Sauerstoff (Marques *et al.*, 2013). Eine offene, durch ein Aspartat koordinierte Struktur des proximalen [4Fe4S]-Clusters wurde in *Allochromatium vinosum* beobachtet, jedoch im inaktiven Ni_u -A-Zustand (Ogata *et al.*, 2010). In der AH verändert die Ligandierung durch ein Aspartat jedoch vermutlich das Potential des Clusters. Für ein Ferredoxin aus *Pyrococcus furiosus* wurde gezeigt, dass das durch drei Cysteine und ein Aspartat koordinierte Wildtyp-Protein ein höheres Redoxpotential besitzt als eine durch vier Cysteine koordinierte Variante (Tabelle 4-2; Brereton *et al.*, 1998). Dies lässt sich durch die stärker elektronenziehende Wirkung des Aspartatliganden erklären, wodurch der reduzierte Zustand des Clusters stabilisiert wird. Zudem könnte das Aspartat entweder als einzähniger oder als zweizähniger, chelatisierender Ligand eines Fe-Atoms fungieren und hierdurch das Potential des [4Fe4S]-Clusters auf eine zusätzliche Art modifizieren (Sham *et*

al., 2002). Die in der Struktur der AH gefundenen Bindungsabstände zwischen dem Fe des Clusters und den O-Atomen des Aspartats lassen beide Varianten zu. Eventuell kann durch einen Wechsel zwischen einzähniger und zweizähniger Ligandierung das Potential zusätzlich verändert werden. Diese Resultate sowie Studien an AH-Varianten mit Aspartat-Substitutionen (Kapitel 3.8; Diskussion in Kapitel 4.3.4) deuten darauf hin, dass der proximale [FeS]-Cluster bei der AH wie im Falle der sauerstofftoleranten Gruppe 1-Hydrogenasen (Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012) eine wichtige Rolle in der Sauerstofftoleranz des Enzyms spielt.

Tabelle 4-2: Redoxpotentiale der [FeS]-Cluster verschiedener Gruppe 1- [NiFe]-Hydrogenasen und bei Mutationen an [FeS]-Clustern beobachtete Veränderungen des Potentials

Ursprungsorganismus	Proximaler Cluster	Medialer Cluster	Distaler Cluster*
<i>R. eutropha</i> (MBH) ¹	+160 mV/ -60 mV	+25 mV	-180 mV*
<i>E. coli</i> (Hyd 1) ²	+230 mV/ +30 mV	+130 mV	- *
<i>A. aeolicus</i> (Hyd-1) ³	+232 mV/ +87 mV	+68 mV	-78 mV*
<i>D. gigas</i> ⁴	-290 mV	-35 mV/-70 mV	-340 mV*
<i>D. fructosovorans</i> ⁵	-340 mV	+65 mV	-340 mV*
Veränderungen der Clusterkoordination/-zusammensetzung durch ortsspezifische Mutagenese		Veränderung des Redoxpotentials	
[4Fe4S](Cys) ₃ Asp → [4Fe4S](Cys) ₄ ⁶		-58 mV	
[4Fe4S](Cys) ₃ Asp → [4Fe4S](Cys) ₃ Ser ⁶		-133 mV	
[3Fe4S] → [4Fe4S]		-300 mV ⁵ / -280 mV ⁷	

Referenzen: ¹ Knüttel *et al.*, 1994; ² Roessler *et al.*, 2013; ³ Pandelia *et al.*, 2011; ⁴ Teixeira *et al.*, 1989; ⁵ Rousset *et al.*, 1998; ⁶ Brereton *et al.*, 1998; ⁷ Manodori *et al.*, 1992. Die Gruppe 1-Hydrogenasen aus *R. eutropha* und *A. aeolicus* sind sauerstofftolerant und besitzen einen proximalen [4Fe3S]-Cluster; die Vertreter aus *D. gigas* und *D. fructosovorans* sind Standard-Hydrogenasen. Die Untersuchungen aus Ref. 6 und 7 wurden nicht an Hydrogenasen durchgeführt.

* Die Potentiale der distalen Cluster sind wahrscheinlich nicht korrekt, da diese Cluster offenbar EPR-inaktiv sind und eine Potentialbestimmung somit nicht möglich ist (Roessler *et al.*, 2012)

Auch der mediale [FeS]-Cluster in der AH ist gegenüber den meisten Gruppe 1- [NiFe]-Hydrogenasen verändert. Mit Ausnahme der Subgruppe der [NiFeSe]-Hydrogenasen koordinieren in Letzteren drei Cysteine einen [3Fe4S]-Cluster und die Stelle des vierten potenziellen Liganden wird durch ein Prolin besetzt. Die AH besitzt genau an dieser Stelle ein viertes Cystein, was zur Ausbildung eines [4Fe4S]-Clusters führt. Mediale [4Fe4S]-Cluster kommen ebenfalls in [NiFeSe]-Hydrogenasen und in regulatorischen Hydrogenasen vor (Garcin *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2010; Kleihues *et al.*, 2000; Shafaat *et al.*, 2013; Roncaroli *et al.*, in Preparation). Der gegenüber Gruppe 1-Hydrogenasen veränderte mediale Cluster dürfte Auswirkungen auf den Elektronentransport in der AH haben. Der mediale [3Fe4S]-Cluster hat in der Regel ein deutlich höheres Potential als [4Fe4S]-Cluster (Tabelle 4-2; Roberts & Lindahl, 1994; Pershad *et al.*, 1999; Roessler *et al.*, 2012), und kann so möglicherweise ein weiteres Elektron bereithalten, was für die schnelle Bildung eines Ni_i-B-

anstelle eines Ni_u-A-Zustandes benötigt wird (Evans *et al.*, 2013). Die Umwandlung des medialen [3Fe4S]-Clusters in einen [4Fe4S]-Cluster in der sauerstofftoleranten Hydrogenase 1 aus *E. coli* führten zu sauerstoffsensitivem Verhalten (Evans *et al.*, 2013). Die genannte Clusterumwandlung führte auch zu einer deutlichen Erniedrigung des Cluster-Potentials (Tabelle 4-2; Manodori *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1998). Somit dürfte auch der mediale [FeS]-Cluster der AH ein recht niedriges Potential besitzen und könnte damit zu den ungewöhnlichen katalytischen Eigenschaften der AH beitragen.

In Tabelle 4-2 sind die Potentialwerte der einzelnen [FeS]-Cluster verschiedener Hydrogenasen sowie die Potentialänderungen von Clusterumwandlungen zusammengefasst. Es wurde jedoch angezweifelt, ob die für die distalen Cluster angegebenen Werte zutreffen, da Potentialbestimmungen der [FeS]-Cluster mittels EPR-Spektroskopie durchgeführt wurden und distale Cluster EPR-inaktiv sein müssten (Roessler *et al.*, 2012). Falls sich diese Werte in vergleichbarer Weise auf die AH anwenden lassen, könnte dies bedeuten, dass der proximale [FeS]-Cluster möglicherweise ein Potential hat, das im Bereich von etwa -150 bis -250 mV zwischen dem der sauerstofftoleranten Hydrogenasen und dem der Standard-Hydrogenasen liegt. Für den medialen [FeS]-Cluster könnte gemäß dieser Abschätzung ein Potential von unter -200 mV angenommen werden. Für den distalen [FeS]-Cluster beinhalten die verfügbaren Daten keinerlei Hinweise auf das zu erwartende Potential.

Die Redoxpotentiale der einzelnen [FeS]-Cluster müssten durch EPR-Spektroskopie bestimmt werden, jedoch konnten bislang keine EPR-Signale der AH beobachtet werden. Da in der AH ausschließlich [4Fe4S]-Cluster vorkommen, lässt sich die Abwesenheit von EPR-Signalen im oxidierten Zustand der AH leicht dadurch erklären, dass alle drei Cluster als [4Fe4S]²⁺-Cluster mit dem Spinzustand $S = 0$ vorkommen, der EPR-inaktiv ist (Johnson *et al.*, 2005). Jedoch wurden auch nach Reduktion der AH mit H₂ keine EPR-Signale der [FeS]-Cluster gefunden. Die Möglichkeit, dass die [FeS]-Cluster sich durch H₂ nicht reduzieren ließen ist unwahrscheinlich, da das [NiFe]-Zentrum leicht mit H₂ reagierte (Kapitel 3.7.2). Auch für die RH aus *R. eutropha* wurden keine EPR-Signale der [FeS]-Cluster im reduzierten Zustand erhalten (Bernhard *et al.*, 2001; Brecht *et al.*, 2003). Mößbauer-Spektroskopie zeigte jedoch, dass etwa zwei der drei [4Fe4S]-Cluster im Redoxzustand [4Fe4S]⁺ vorkommen, der auf Grund seines Spinzustandes $S = 1/2$ durch EPR-Spektroskopie detektierbar sein sollte (Roncaroli *et al.*, in Preparation). Dass dennoch keine EPR-Signale erhalten wurden, wurde mit magnetischen Interaktionen der [FeS]-Cluster begründet. Diese Erklärung erscheint auch im Falle der AH als plausible Möglichkeit. Eine andere Erklärung wäre, dass die reduzierten Cluster nicht den üblichen $S = 1/2$ -Grundzustand besitzen, was auch schon für die reduzierten proximalen [4Fe4S]-Cluster in den entsprechenden Varianten der MBH aus *R. eutropha* und der Hydrogenase 1 aus *E. coli* diskutiert wurde (Lukey *et al.*, 2011; Goris *et al.*, 2011). Was im Falle der AH zutrifft ist mit den bekannten Daten nicht zu klären und bleibt Gegenstand für zukünftige Untersuchungen.

4.3.4 Variation des Aspartats am proximalen Cluster modifiziert die O₂-Toleranz der AH

Die Koordination des proximalen [FeS]-Clusters durch drei Cysteine und ein Aspartat ist ein charakteristisches Merkmal der AH, genau wie ihre Insensitivität gegenüber Sauerstoff. Der veränderte proximale Cluster einiger Gruppe 1-Hydrogenasen ist entscheidend für die

Sauerstofftoleranz dieser Enzyme (Fritsch *et al.*, 2011b; Shomura *et al.*, 2011; Volbeda *et al.*, 2012), daher wurde auch für die AH ein Zusammenhang dieser Merkmale angenommen.

Es wurden daher Varianten der AH konstruiert, die anstelle des Asp35 in HofK die Aminosäuren Cys, Ser, Asn und Ala trugen. Alle Varianten besaßen H₂-Oxidationsaktivität und zeigten ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten in Gegenwart von Sauerstoff. Mit Cys und Ser wurde auch in Gegenwart von Sauerstoff eine kontinuierliche Aktivität gefunden, wenngleich auch geringer als in Abwesenheit von Sauerstoff. Hingegen führte die Gegenwart von Sauerstoff bei den Asp35Asn- und Asp35Ala-Varianten zur raschen Inaktivierung der Proteine, welche sich in den Messungen durch eine H₂-Oxidationsaktivität bemerkbar machte, die nach Messbeginn schnell zum Erliegen kam. Austausch eines ligandierenden Aspartats wurden bereits in einem Ferredoxin vorgenommen, wobei auch dort stets aktives Mutanten-Protein erhalten wurde (Brereton *et al.*, 1998). Cytin und Serin als alternative Liganden führten zur Ausbildung eines [4Fe4S]-Clusters, während mit den Aminosäuren Histidin bzw. Asparagin [3Fe4S]-Cluster gebildet wurden. Die Potentiale lagen dabei für die Varianten mit Cys bzw. Ser niedriger als dasjenige des Wildtyps (Tabelle 4-2). Für die Varianten His bzw. Asn wurden dort aufgrund der Umwandlung in einen [3Fe4S]-Cluster deutlich höhere Potentiale als im Wildtyp bestimmt. Somit wäre es wahrscheinlich, dass in der AH mit Cys und Ser der [4Fe4S]-Cluster erhalten bleibt, während mit Asn und Ala möglicherweise [3Fe4S]-Cluster gebildet werden. Durch verschiedene proximale [FeS]-Cluster der Varianten ließe sich eventuell das unterschiedliche Verhalten in Gegenwart von Sauerstoff erklären.

Die mit Sauerstoff verringerte, aber stabile Aktivität der Cys- und Ser-Varianten dürfte auf veränderte Potentiale zurückzuführen sein, die den Elektronentransport beeinflussen. Die in den Asn- und Ala-Varianten gefundene Situation hingegen ist mit den verfügbaren Daten schwieriger zu interpretieren. Es ist denkbar, dass der [FeS]-Cluster durch Sauerstoff inaktiviert wird. Diese Proteinvarianten wurden zwar bei aerober Reinigung in aktivem Zustand erhalten, jedoch werden vermutlich bei der H₂-Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies gebildet, welche diese Proteinvarianten der AH schnell inaktivieren. Eine eventuelle Reaktivierbarkeit dieser Mutantenproteine könnte zukünftig mit Hilfe elektrochemischer Methoden untersucht werden. In verschiedenen oxidierten [NiFe]-Hydrogenasen wurden Schädigungen des proximalen Clusters beobachtet (Matias *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2010). Über die Beteiligung des proximalen Clusters in der Inaktivierung durch Sauerstoff wurde spekuliert (Marques *et al.*, 2013). Wichtiges Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte daher sein, die in diesen AH-Varianten auftretenden Zustände sowohl des [NiFe]-Zentrums als auch der [FeS]-Cluster aufzuklären. Hierzu bietet sich die Untersuchung der Mutantenproteine mittels IR- und EPR-Spektroskopie an. Auch elektrochemische Untersuchungen könnten zur Aufklärung dieser Fragen durchgeführt werden.

4.3.5 Mögliche Faktoren für die Sauerstoff-Insensitivität der AH

Hydrogenasen werden durch Sauerstoff in vielen Fällen irreversibel inaktiviert, jedoch kann eine Reihe von [NiFe]-Hydrogenasen auch in Gegenwart von Sauerstoff Katalyse betreiben (Fritsch *et al.*, 2013). Bei energiekonservierenden [NiFe]-Hydrogenasen bedeutete Sauerstofftoleranz bislang, dass das Enzym mit steigender Sauerstoffkonzentration abnehmende katalytische Aktivität zeigt, aber nach Entfernung des Sauerstoffs schnell und

vollständig reaktiviert wird (Vincent *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2007). Die vollständige Erhaltung der H_2 -Oxidationsaktivität in Gegenwart von Sauerstoff wurde bislang ausschließlich für regulatorische [NiFe]-Hydrogenasen wie die RH aus *R. eutropha* oder aus *Rhodobacter capsulatus* beschrieben (Vignais *et al.*, 1997; Bernhard *et al.*, 2001).

Die AH aus *R. eutropha* ist ebenfalls in der Lage, H_2 in Gegenwart von Sauerstoff mit der gleichen katalytischen Aktivität zu oxidieren wie in Abwesenheit von Sauerstoff (Kapitel 3.6.7). Sie ist damit die erste Hydrogenase mit mutmaßlich energiekonservierender Funktion (diskutiert in Kapitel 4.4.2), für die diese Eigenschaft beschrieben wurde. Zur Unterscheidung von dem Verhalten anderer sauerstofftoleranter Hydrogenasen in Gegenwart von O_2 wurde für das Verhalten der AH daher der Begriff der Sauerstoff-Insensitivität eingeführt. Verschiedene strukturelle und funktionelle Eigenschaften wurden in den voranstehenden Kapiteln diskutiert, von denen viele einen Einfluss auf die Sauerstoff-Insensitivität der AH haben können. Entscheidend für die Sauerstofftoleranz einer Hydrogenase ist, dass sowohl die irreversible Inaktivierung des Enzyms durch O_2 als auch das Auftreten schwer reaktivierbarer Zustände des [NiFe]-Zentrums vermieden wird (De Lacey *et al.*, 2007; Cracknell *et al.*, 2009). Die bislang bekannten Strategien hierzu beruhen entweder auf schneller und vollständiger Reduktion von bindendem Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid oder Wasser und einem Hydroxo-Liganden (Fritsch *et al.*, 2011b; Volbeda *et al.*, 2012; Lauterbach & Lenz, 2013), oder darauf, dass die Bindung von Sauerstoff am [NiFe]-Zentrum verhindert wird (Buhrke *et al.*, 2005; Duche *et al.*, 2005).

Die Sauerstoff-Insensitivität regulatorischer Hydrogenasen wurde auf eine Verengung des zum aktiven Zentrum führenden Gaskanals durch voluminöse Aminosäurereste zurückgeführt (Volbeda *et al.*, 2002; Buhrke *et al.*, 2005; Duche *et al.*, 2005). Die Ni_U -A- und Ni_I -B-Zustände von Standard-Hydrogenasen werden in dieser Gruppe nicht beobachtet (Bernhard *et al.*, 2001; Brecht *et al.*, 2003). In der AH treten diese Zustände ebenfalls nicht auf, was möglicherweise bedeutet, dass in der AH keine Zustände des aktiven Zentrums mit gebundenen Sauerstoffspezies vorkommen. In der AH konnte eine Verengung des Gaskanals an der zu den regulatorischen Hydrogenasen analogen Position nicht festgestellt werden. In der AH scheint der Gaskanal jedoch, soweit aus der vorläufigen Analyse zu beurteilen, insgesamt deutlich enger zu sein als in anderen bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen. Daher könnte der Zugang von O_2 zum aktiven Zentrum an einer anderen Stelle des Kanals verhindert werden. Für eine präzisere Beurteilung des Verlaufs und der Größe des Gaskanals der AH sind jedoch weitere Experimente und Berechnungen erforderlich. Für diese Begründung der O_2 -Insensitivität der AH spricht das Fehlen von Ni_U -A- und Ni_I -B-Zuständen im katalytischen Zyklus. Jedoch wurde gezeigt, dass der Austausch des Aspartats am proximalen [4Fe4S]-Cluster gegen andere Aminosäuren einen Einfluss auf die Sauerstofftoleranz der AH hat (Kapitel 3.8 und 4.3.4), was mit der Gaskanal-Hypothese nicht kompatibel ist.

Wie in Kapitel 4.3.3 diskutiert wurde, besitzt die AH eine ungewöhnliche Elektronentransportkette, deren proximaler, durch ein Aspartat ligandierter [4Fe4S]-Cluster vermutlich ein höheres Redoxpotential als Standard-Hydrogenasen aufweist, während der mediale [4Fe4S]-Cluster in der AH ein deutlich niedrigeres Redoxpotential als die sonst auftretenden [3Fe4S]-Cluster haben dürfte. Zudem wechselwirken im AH-Dimer wahrscheinlich die Elektronentransportketten der beiden Monomere über den distalen [4Fe4S]-Cluster, was

sich laut der in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 aufgestellten Hypothese in den FTIR-Signalen der CN- und CO-Liganden am aktiven Zentrum bemerkbar macht.

Der proximale [4Fe4S]-Cluster ist an der Vermittlung der O₂-Toleranz der AH beteiligt, wie die Experimente mit an der Position des Aspartats modifizierten Varianten der AH belegen. Die Rolle des Aspartats am proximalen Cluster scheint aber nicht so entscheidend zu sein wie die Rolle des [4Fe3S]-Clusters in der MBH (Goris *et al.*, 2011; Fritsch *et al.*, 2011b). Es ist zwar vorstellbar, dass durch eine zweizählige Ligation eines Eisens durch das Aspartat wie in sauerstofftoleranten Gruppe 1-Hydrogenasen ein zusätzlicher Zustand geschaffen wird, der in den Varianten mit Cys und Ser nicht auftritt. Eine zusätzliche, geöffnete Struktur eines oxidierten [4Fe4S]-Clusters, welche durch ein Aspartat koordiniert wird, ist für die [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* beschrieben (Ogata *et al.*, 2010). Allerdings wurde diese in einem inaktiven Ni_u-A-Zustand gefunden und die Modifikationen am proximalen FeS-Cluster sind sehr wahrscheinlich irreversibel. In der AH finden sich in den bisherigen spektroskopischen Untersuchungen keinerlei Hinweise auf einen zusätzlichen Zustand, jedoch könnte dieser auch sehr kurzlebig und daher nicht detektierbar sein.

Denkbar ist hingegen, dass die möglicherweise gekoppelten Elektronentransportketten im AH-Dimer erhöhte Flexibilität des Elektronenflusses gewährleisten. Sollten sich die in Kapitel 4.3.3 diskutierten möglichen Potentiale der [FeS]-Cluster bewahrheiten, läge eine Elektronentransportkette mit verglichen zu anderen Hydrogenasen (Tabelle 4-2) recht geringen Potentialdifferenzen zwischen den einzelnen [FeS]-Clustern vor. Elektronen könnten dann thermodynamisch günstig in beide Richtungen der Elektronentransportkette fließen. Ein durch Sauerstoff inaktiviertes Monomer der AH könnte in diesem Fall rasch durch Elektronen, die von dem zweiten Monomer des Dimers bereitgestellt werden, reaktiviert werden. Die Beobachtung, dass sich eine inaktivierte Hydrogenase rasch durch Elektronen von einem aktiven Enzym reaktivieren lässt, wurde bereits für die Hydrogenase 1 aus *E. coli* gemacht (Wait *et al.*, 2010). Um den Wahrheitsgehalt dieser Mutmaßung einschätzen zu können müssten jedoch die Potentiale der einzelnen [FeS]-Cluster der AH experimentell bestimmt werden. In einer derartigen Strategie zur Sauerstofftoleranz der AH bliebe jedoch offen, weshalb kein Ni_r-B-Zustand auftritt und hierdurch Sauerstoff-Insensitivität erzielt wird.

In der Aufklärung des Mechanismus der O₂-Insensitivität konnten bislang somit nur erste Ergebnisse erzielt werden; weiterführende Untersuchungen zu dem zu Grunde liegenden Mechanismus stellen daher eine Hauptaufgabe für die zukünftige Forschung an der AH dar.

4.4 Physiologische Rolle der AH

R. eutropha produziert nach aktuellem Kenntnisstand vier aktive [NiFe]-Hydrogenasen; drei davon sind energiekonservierende Enzyme, durch die H₂ als Energiequelle für den Organismus erschlossen wird. Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) und die lösliche Hydrogenase (SH) sind hochaktive Enzyme, die bei Bedarf in großen Mengen produziert werden. Mit Hilfe dieser zwei Enzyme ist *R. eutropha* in der Lage, lithoautotroph mit H₂ als Energie- und CO₂ als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die AH hingegen besitzt nur geringe H₂-Oxidationsaktivität und wird unter den Bedingungen, unter denen MBH und SH in starkem

Maße produziert werden, nur wenig gebildet. Stämme von *R. eutropha*, die die AH als einzige Hydrogenase enthielten, zeigten zudem unter lithoautotrophen Bedingungen kein nachweisbares Wachstum. Daher erfüllt die AH wahrscheinlich eine andere Funktion als die MBH und die SH.

4.4.1 Die Regulation der AH

Die bisherigen Erkenntnisse zu anderen Gruppe 5-Hydrogenasen lassen bereits auf die Rolle dieser Enzyme schließen. In *Streptomyces str. PCB7* wurde die hochaffine H_2 -Oxidationsaktivität ausschließlich im Stadium der Sporulation gefunden (Constant *et al.*, 2008). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Hydrogenase unter regulären Wachstumsbedingungen nicht benötigt wird, aber eine Rolle im Erhaltungsstoffwechsel unter schlechten Bedingungen spielt. Für die Gruppe 5-Hydrogenase aus *Mycobacterium smegmatis* wurde die höchste Aktivität sowie die höchste Genexpression unter Limitation der Kohlenstoffzufuhr festgestellt (Berney & Cook, 2010; Berney *et al.*, 2013). Auch Sauerstoffmangel führte hier zu einer mäßig erhöhten Expression der entsprechenden Gene. Zudem hatte die Deletion dieser Hydrogenase-Gene in *Mycobacterium smegmatis* eine deutliche Verringerung der maximalen Zelldichte einer Flüssigkultur zur Folge (Berney & Cook, 2010). Somit ergibt sich das Bild, dass Gruppe 5-Hydrogenasen vor Allem unter Energie- bzw. Nährstofflimitation benötigt werden.

Diese Aussage kann im Großen und Ganzen auch für die AH aus *Ralstonia eutropha* bestätigt werden. Die H_2 -Oxidationsaktivität der AH konnte ausschließlich unter stationären Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden. Diese Wachstumsphase tritt bei *R. eutropha* im regulär verwendeten Fructose-Glycerin-Anzuchtmedium vermutlich auf Grund von Kohlenstofflimitation ein. Die AH wird also offenbar ebenfalls unter limitierten Wachstumsbedingungen gebildet. Obwohl zahlreiche C-Quellen getestet wurden, konnte die Aktivität der AH ausschließlich mit Fructose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden. Insbesondere Glycerin begünstigt die Produktion aktiver AH. Dieses Substrat kann von *R. eutropha* schlecht aufgenommen werden, und führt daher zu sehr langsamen Wachstum (Friedrich *et al.*, 1981). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die Hydrogenase 1 in der stationären Wachstumsphase aktiviert wird (Brøndsted & Atlung, 1994), aber auch ein verlangsamter Kohlenstoff-Metabolismus zu höherer Aktivität derselben führt (Pinske *et al.*, 2012b). Jedoch kann mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden, ob die Kohlenstofflimitation oder ein anderer Faktor entscheidend ist für die Bildung aktiver AH.

Im Gegensatz zur Aktivität ließen sich die Transkripte der AH-Gene sowohl in frühen Wachstumsphasen als auch bei Kultivierung mit weiteren C-Quellen nachweisen (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2.1). Transkripte der AH wurden bereits bei OD 1 gebildet, was in Fructose- oder Glycerinmedium der frühen exponentiellen Phase entspricht (Kapitel 3.2.2.1). Dabei wurde auch die Genexpression der AH mit Succinat als C-Quelle nachgewiesen. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der Methode der Experimente. Die relative Quantifizierung von Transkripten mittels RT-qPCR erlaubt die Erfassung geringster Mengen an Transkript, jedoch wird keine Aussage über die absolute Menge der Transkripte getroffen. Damit ist es wahrscheinlich, dass nur äußerst geringe Mengen von Transkripten gebildet werden. Das aktive Protein kann dann in nicht nachweisbaren, äußerst geringen

Mengen vorliegen, oder es kann aus den nachgewiesenen Transkripten in frühen Wachstumsstadien noch kein aktives Protein gebildet werden.

Das in Kapitel 3.2.2.1 beschriebene Experiment auf Ebene der Genexpression bekräftigt, dass Glycerin eine gute Kohlenstoffquelle für die Bildung der AH darstellt. Bereits in einer frühen Wachstumsphase ist ein deutlicher Unterschied zu der Expression mit einer gut verwertbaren Kohlenstoffquelle wie Fructose zu erkennen. Überraschend ist die vergleichsweise hohe Expression der AH-Gene bei Wachstum auf Succinat, da eine korrespondierende Aktivität der AH weder während der exponentiellen noch der stationären Wachstumsphase identifiziert werden konnte. Es wäre aber denkbar, dass die in diesem Experiment detektierte Transkriptmenge bereits die maximal erreichbare Expression bedeutet. Im Gegensatz zu Fructose und Glycerin erreicht *R. eutropha* mit Succinat als C-Quelle lediglich eine maximale OD₄₃₆ von 1,5-2. Somit befinden sich auf Succinat wachsende Zellen bei OD 1 bereits in der spätexponentiellen Wachstumsphase. Zusammen mit der wahrscheinlich insgesamt äußerst niedrigen Transkriptmenge bei OD 1 (siehe vorhergehender Absatz) ließe sich hiermit die beschriebene Beobachtung erklären.

Auch die Genexpression der AH bei autotrophem Wachstum mit H₂ und CO₂ wurde untersucht (Kapitel 3.2.2.1). Es konnten jedoch nur geringe Transkriptmengen der AH identifiziert werden. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass die AH kein autotrophes Wachstum von *R. eutropha* vermitteln kann (Kapitel 3.2.5.1). Zudem konnte die AH in früheren Studien im Proteom von *R. eutropha* weder unter autotrophen Wachstumsbedingungen noch bei Wachstum mit Succinat als C-Quelle identifiziert werden (Kohlmann *et al.*, 2011). Die Untersuchungen der Genexpression der AH unter autotrophen Wachstumsbedingungen wurden am Wildtyp *R. eutropha* H16 durchgeführt, der aufgrund aktiver MBH und SH in der Lage ist, autotroph mit H₂ und CO₂ zu wachsen. Da somit unter den untersuchten Bedingungen die MBH und die SH aktiv sind und mit deren Hilfe H₂ als Energiequelle genutzt werden kann, erscheint es plausibel, dass die zusätzliche Expression der AH-Gene nicht hilfreich für den Organismus ist. Die Untersuchung der Aktivität der AH war bei autotrophem Wachstum aufgrund der gleichzeitig vorhandenen Aktivitäten von MBH und SH nicht möglich.

Für die Gruppe 5-Hydrogenase in *Mycobacterium smegmatis* wurde eine Steigerung der Transkriptmenge unter Sauerstofflimitation festgestellt. (Berney & Cook, 2010). Dieses Ergebnis entspricht jedoch nicht der Situation, die für die AH in *R. eutropha* gefunden wurde. Sowohl die Genexpression als auch die Aktivität der AH wurde in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration untersucht (Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.3.3). Zur Variation der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkultur wurde dabei die Befüllung der Schüttelkolben mit Nährmedium verändert. Die größte Transkriptmenge und die höchste Aktivität wurden übereinstimmend bei 40 % Befüllung des Kolbens gefunden. Unter dieser Bedingung liegt jedoch noch keine Sauerstofflimitation vor (Fritsch, 2011). Bei höherer Kolbenbefüllung und damit geringerer Sauerstoffkonzentration in der Kultur wurden geringe Genexpression und Aktivität festgestellt. Somit die Sauerstofflimitation keine der Bildung aktiver AH zuträgliche Mangelbedingung. Hierzu konsistent ist auch das Ergebnis, dass sich die Deletion des Regulators FNR3, der bei Sauerstoffmangel aktiv ist, kaum auf die Expression der AH auswirkt (Kapitel 3.2.2.3). Dass die physiologische Aktivität der AH offensichtlich auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen ist, zeigen auch die Daten aus Kapitel 3.2.5.3 und 3.2.5.4, in

denen in lebenden Zellen eine strikte Abhängigkeit der H₂-Oxidationsaktivität der AH von der Anwesenheit von Sauerstoff nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang ist es zudem erwähnenswert, dass die Aktivität der AH auch in Gegenwart von Sauerstoff vollständig erhalten bleibt (Kapitel 3.6.7). Aus diesen gesammelten Ergebnissen lässt sich folgern, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen keine nachteilige Bedingung für die AH darstellen.

Im Gegensatz zur AH wurde für die MBH aus *R. eutropha* unter Sauerstofflimitation eine stark erhöhte Hydrogenaseaktivität festgestellt (Fritsch, 2011). Im Rahmen der Untersuchung zur Genexpression der AH in der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt auf der Ebene der Genexpression für die MBH und deutlich ausgeprägter auch für die SH aus *R. eutropha* bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die AH definitiv anders als die MBH und die SH reguliert wird. Es wurde gefunden, dass die AH bevorzugt unter sauerstoffreicheren Bedingungen und unter bestimmten Nährstoffmangelbedingungen gebildet wird.

4.4.2 Die AH ist eine energiekonservierende Hydrogenase

Die AH besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die ähnlich zu denen einer regulatorischen Hydrogenase sind. So liegt die H₂-Oxidationsaktivität der AH im Bereich der RH aus *R. eutropha* (Tabelle 4-1). Letztere ist zusammen mit einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator Teil einer wasserstoffabhängigen Signaltransduktionskaskade, erfüllt jedoch keine energiekonservierende Funktion (Buhrke *et al.*, 2004; Bernhard *et al.*, 2001). Die Fähigkeit zu autotrophem Wachstum wird durch die AH genauso wenig vermittelt wie durch die RH (Kleihues *et al.*, 2000). Auch die Tatsache, dass die H₂-Oxidationsaktivität einer Hydrogenase selbst in Gegenwart von Sauerstoff vollständig erhalten bleibt, war bislang ausschließlich von regulatorischen Hydrogenasen bekannt (Bernhard *et al.*, 2001; Vignais *et al.*, 1997). Auch die Sequenzähnlichkeit der AH ist zur RH höher als zu den energiekonservierenden Hydrogenasen SH und MBH aus *R. eutropha*.

Aufgrund phylogenetischer Analysen der Gene von Gruppe 5-Hydrogenasen (Leul *et al.*, 2007; Constant *et al.*, 2011b) wurde die Vermutung geäußert, dass *R. eutropha* das Operon der AH mittels horizontalen Gentransfers erworben haben könnte. Daher habe die Hydrogenase im neuen Organismus möglicherweise noch keine oder nur unvollständige Funktionalität erreicht (Constant *et al.*, 2011b). Die geringe Expression der AH-Gene sowie die extrem geringe Aktivität des isolierten Enzyms scheinen diese Hypothese zu unterstützen. Jedoch zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass lebende Zellen von *R. eutropha* mit Hilfe der AH Wasserstoff verbrauchen (Kapitel 3.1.1 und 3.2.5.2) und dass diese Aktivität strikt von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängt (Kapitel 3.2.5.3). Da sich der AH-vermittelte H₂-Verbrauch in lebenden Zellen zudem durch Inhibitoren der terminalen Oxidasen hemmen ließ (Kapitel 3.2.5.4), wurde damit eine Kopplung der AH an die aerobe Atmungskette nachgewiesen. Die AH ist somit eine energiekonservierende Hydrogenase, die in *R. eutropha* eine physiologische Funktion erfüllt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die AH in *R. eutropha* nur partielle Funktionalität erreicht hat.

Wie in Kapitel 4.2.2 diskutiert wurde ist die Affinität des Enzyms nicht ausreichend hoch, um die Aufnahme von H₂ aus der Luft zu ermöglichen. Diese Fähigkeit könnte besonders unter energielimitierten Bedingungen, welche offenbar die Bildung aktiver AH begünstigen (siehe Kapitel 4.4.1), einen großen Vorteil für den Organismus darstellen. Für die Funktion der AH

könnten unter Anderem die im Operon der AH codierten unbekannten Proteine eine Rolle spielen. Es kann nicht beurteilt werden, ob aus den unbekannten Genen des AH-Operons Proteine gebildet werden und welche Funktionen diese vermuteten Proteine erfüllen. Da diese Gene in Gruppe 5-Operons streng konserviert vorkommen, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Proteine funktional sind (Yanai *et al.*, 2002). Die Funktion dieser Proteine im Elektronentransport unter physiologischen Bedingungen wurde bereits zuvor vermutet (Constant *et al.*, 2011b). Der bislang nicht identifizierte physiologische Akzeptor der AH könnte somit durch eines der unbekannten Gene im AH-Operon codiert werden. Der wahrscheinlichste Kandidat ist hierbei das Protein PHG067. In diesem sind die Motive für die Koordination von 1-2 [FeS]-Clustern vorhanden. Ein weiteres in den Operons der Gruppe 5-Hydrogenasen codiertes Protein besitzt in den meisten Vertretern konservierte Motive für die Koordination von [FeS]-Clustern. Im entsprechenden Protein PHG066 aus *R. eutropha* fehlen jedoch die Cysteine dieser Motive. Dieser Unterschied könnte vielleicht die Funktionalität der AH beeinflussen. Zwei weitere der im AH-Operon codierten unbekannten Proteine, PHG068 und PHG069, enthalten laut mehrerer Vorhersage-Programme jeweils 1-2 mögliche Transmembran-Helices. Diese Proteine könnten somit an der Cytoplasmamembran gebunden sein. Jedoch enthalten beide Proteine keine Motive für die Koordination von [FeS]-Clustern oder anderer Cofaktoren, die für den Transport von Elektronen benötigt würden. Generell ist es auch denkbar, dass der native Elektronenakzeptor der AH ein membrangebundenes Protein ist, und die AH entweder nur eine transiente Interaktion eingeht oder die Bindung so schwach ist, dass die AH bei dem eingesetzten Reinigungsverfahren weitestgehend von der Membran abgelöst wird. Eine Ablösung der Hydrogenase-Untereinheiten von einem membrangebundenen Elektronenakzeptor wird auch bei der MBH aus *R. eutropha* beobachtet (Frielingsdorf *et al.*, 2011).

Die Struktur der vermuteten Bindestelle für den Akzeptor dürfte der entscheidende Faktor für die Akzeptorspezifität der AH sein. Um in zukünftigen Studien die Rolle der unbekannten Proteine zu untersuchen sollten die entsprechenden Gene einzeln sowie gemeinsam deletiert werden. An den hierdurch erzeugten Mutanten von *R. eutropha* könnten wertvolle Ergebnisse zur Funktion der Proteine gewonnen werden.

4.5 Maturation der AH

Wie in Kapitel 1.4.4 kurz beschrieben, werden für die Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen im Allgemeinen sechs Reifungsfaktoren benötigt, um den korrekten Einbau des [NiFe]-Zentrums mit dem CO- und den zwei CN-Liganden zu bewerkstelligen (Böck *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2013). In *R. eutropha* sind die Gene dieser Faktoren in mindestens zwei Kopien vorhanden (Schwartz *et al.*, 2003). Ein kompletter Satz dieser Gene findet sich jeweils in den Operons der MBH und der AH, im Operon der SH sind die Gene *hypABF* in einer dritten Kopie codiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Maturationsfaktoren des MBH- und SH-Operons sich gegenseitig ersetzen können (Dernedde *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1998). Auch die AH kann den Daten der vorliegenden Arbeit zufolge sowohl durch die im AH-Operon codierten Hyp-Proteine als auch durch die Reifungsfaktoren der SH und MBH vollständig maturiert werden. Zudem liefern die Arbeiten von Dernedde *et al.*, 1996, Wolf *et al.*, 1998 und Buhrke *et al.*, 2001, Hinweise darauf, dass auch die Hyp-Proteine des AH-Operons die anderen

Hydrogenasen in *R. eutropha* maturieren können. In diesen Untersuchungen wurden auch in Stämmen, denen jeweils beide im MBH- und SH-Operon vorkommenden Kopien der Gene *hypA*, *hypB* und *hypF* deletiert worden waren, noch beachtliche Restaktivitäten insbesondere der SH und der RH gefunden (42 % Restaktivität der SH und 82 % Restaktivität der nativ exprimierten RH für $\Delta hypA1A2$; Wolf *et al.*, 1998; Buhrke *et al.*, 2001). Die SH und die RH könnte demzufolge zu einem geringen Teil auch durch die im AH-Operon codierten Reifungsfaktoren maturiert werden. Somit können auch die Hyp-Proteine des AH-Operons wahrscheinlich andere Hyp-Proteine ersetzen bzw. durch diese ersetzt werden.

4.6 Heterologe Expression von Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*

Für Gruppe 5-Hydrogenasen wurde postuliert, dass die hochaffine Aufnahme von Wasserstoff eine charakteristische Eigenschaft dieser Enzyme ist (Constant *et al.*, 2010; Constant *et al.*, 2011b). Jedoch konnte für die AH aus *R. eutropha* lediglich eine mäßige Affinität für H₂ gezeigt werden, die die Affinität von Hydrogenasen anderer Gruppen nicht übersteigt (Kapitel 3.6.3 und 4.2.2). Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob dieser Unterschied trotz der hohen Sequenzähnlichkeit durch die Strukturen der Enzyme hervorgerufen wird, oder ob vielmehr das metabolische Umfeld im jeweiligen Organismus diese Veränderung auslöst. Aus diesem Grund wurden Stämme von *R. eutropha* konstruiert, die exemplarisch zwei Gruppe 5-Hydrogenasen aus anderen Organismen produzieren sollten. Hierfür wurde ein System verwendet, in dem nur die Strukturgene der Hydrogenasen auf einem Plasmid überexprimiert wurden während die Reifung der Hydrogenasen durch die auf dem Megaplasmid pHG1 codierten Maturationsfaktoren der AH gewährleistet werden sollte. Das entsprechende System mit den Genen *hofKG* der AH erzielte eine gute Produktion des Enzyms, und diente somit als Basis für die heterologe Expression.

Zuvor war es bereits gelungen, die membrangebundene Hydrogenase aus *Ralstonia metallidurans* in *R. eutropha* heterolog zu produzieren (Ludwig *et al.*, 2009a). Hierbei wurde jedoch das gesamte Operon der MBH auf einem Plasmid überexprimiert. Die heterologe Produktion der löslichen Hydrogenase aus *Rhodococcus opacus* in *R. eutropha* führte zwar auch ohne Überproduktion der benötigten Hyp-Proteine zu aktivem Protein, jedoch wurden höhere Aktivitäten gefunden, wenn auch ein Teil der Hyp-Proteine ebenfalls überproduziert wurden (Porthun *et al.*, 2002). Für die heterolog produzierten Hydrogenasen der Gruppe 5 konnten zwar geringe Spuren von Aktivität in *R. eutropha* nachgewiesen werden (Kapitel 3.9.2), die gebildete Proteinmenge war aber für eine Reinigung bei weitem nicht ausreichend. Da die AH in einem identischen Expressionssystem in guten Ausbeuten gereinigt werden kann (Kapitel 3.3.3) ist die äußerst geringe Ausbeute nicht auf die geringere Menge der Maturationsfaktoren zurückzuführen. Der Grund dürfte somit darin liegen, dass die fremden Enzyme zu mindestens einem der Maturationsfaktoren nicht kompatibel sind. Die im AH-Operon codierten Hyp-Proteine können, wie in Kapitel 4.5 diskutiert, durch homologe Proteine ersetzt werden, und auch ihrerseits mutmaßlich diese ersetzen. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Faktoren zu spezifisch sind um die zur AH eng verwandten Gruppe 5-Hydrogenasen anderer Organismen zu maturieren. Der wahrscheinlichste Grund, weshalb keine aktiven Hydrogenasen heterolog produziert werden, sind die spezifischen Endoproteasen, welche während des Reifungsprozesses die C-terminalen Ende der jeweiligen

großen Untereinheiten entfernen. Die C-Termini der großen Untereinheiten der besprochenen Hydrogenasen zeigen zueinander eine deutlich geringere Sequenzähnlichkeit als der Rest der Proteine. Somit ist es wahrscheinlich, dass die im AH-Operon codierte Endoprotease zu spezifisch ist, um die Hydrogenasen aus *S. avermitilis* bzw. *M. smegmatis* zu prozessieren.

Für zukünftige Untersuchungen sollte daher das vorhandene System zur heterologen Produktion dieser Hydrogenasen in *R. eutropha* dahin gehend modifiziert werden, dass die jeweilige spezifische Endoprotease zusammen mit den Strukturproteinen auf einem Plasmid codiert wird und gemeinsam mit diesen produziert wird.

4.7 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu verschiedenen Themen an der AH durchgeführt, jedoch ergaben sich auch weitere Fragestellungen, die ein interessantes Feld für zukünftige Untersuchungen eröffnen. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf zwei Themengebieten ruhen. Zum Einen können weitere Erkenntnisse zum katalytischen Zyklus und den Grundlagen der O₂-Insensitivität das Verständnis dieser Eigenschaften verbessern, was auch für die Anwendung von Hydrogenasen in biologischen Brennstoffzellen von Interesse sein kann. Hierfür sollten weitere spektroskopische und elektrochemische Untersuchungen an nativer AH und AH-Varianten durchgeführt werden. Zum Anderen ist die Rolle der AH in *R. eutropha* und generell von Gruppe 5-Hydrogenasen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wäre es nützlich, ein System zur heterologen Expression anderer Gruppe 5-Hydrogenasen in *R. eutropha* zu entwickeln, das eine Isolierung derselben ermöglicht. Hiermit könnte unter anderem die Fragestellung geklärt werden, ob die hohe Affinität zu Wasserstoff, die offenbar ein Merkmal vieler, aber nicht aller Gruppe 5-Hydrogenasen ist, trotz der engen Verwandtschaft in den Proteinen selbst begründet liegt oder ob vielmehr das metabolische Umfeld des einzelnen Organismus entscheidend ist. Hiermit könnte nicht nur die Grundlage für die Affinität dieser Enzyme aufgeklärt, sondern auch das Verständnis der Rolle von H₂-oxidierenden Bakterien im biogeochemischen Zyklus erweitert werden.

5 Literatur

- Abou Hamdan, A., Burlat, B., Gutierrez-Sanz, O., Liebgott, P. P., Baffert, C., De Lacey, A. L., Rousset, M., Guigliarelli, B., Leger, C., & Dementin, S. (2013). O₂-independent formation of the inactive states of NiFe hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 15-17.
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., & Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* **66**, 213-221.
- Aragno, M., & Schlegel, H. G. (1992). The mesophilic hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria. in *The Prokaryotes* (Hrsg.: Balows, H. G., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., & Schleifer, K. H.), Springer, New York. pp 344-384.
- Armstrong, F. A., Belsey, N. A., Cracknell, J. A., Goldet, G., Parkin, A., Reisner, E., Vincent, K. A., & Wait, A. F. (2009). Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chem Soc Rev* **38**, 36-51.
- Berney, M., & Cook, G. M. (2010). Unique flexibility in energy metabolism allows mycobacteria to combat starvation and hypoxia. *PLoS One* **5**, e8614.
- Berney, M., Greening, C., Hards, K., Collins, D., & Cook, G. M. (2013). Three Different [NiFe]-Hydrogenases Confer Metabolic Flexibility in the Obligate Aerobe *Mycobacterium smegmatis*. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.12320.
- Bernhard, M., Schwartz, E., Rietdorf, J., & Friedrich, B. (1996). The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J. Bacteriol.* **178**, 4522-4529.
- Bernhard, M., Benelli, B., Hochkoeppler, A., Zannoni, D., & Friedrich, B. (1997). Functional and structural role of the cytochrome *b* subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur. J. Biochem.* **248**, 179-186.
- Bernhard, M., Buhrke, T., Bleijlevens, B., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Albracht, S. P., & Friedrich, B. (2001). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 15592-15597.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293-300.
- Best, S. P. (2005). Spectroelectrochemistry of hydrogenase enzymes and related compounds. *Coordin. Chem. Rev.* **249**, 1536-1554.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bleijlevens, B., van Broekhuizen, F. A., De Lacey, A. L., Roseboom, W., Fernandez, V. M., & Albracht, S. P. J. (2004). The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 743-752.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S., & Bock, A. (2002). Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 674-680.
- Blokesch, M., Paschos, A., Bauer, A., Reissmann, S., Drapal, N., & Böck, A. (2004). Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3428-3436.
- Böck, A., King, P. W., Blokesch, M., & Posewitz, M. C. (2006). Maturation of hydrogenases. *Adv. Microb. Physiol.* **51**, 1-71.
- Brecht, M., van Gastel, M., Buhrke, T., Friedrich, B., & Lubitz, W. (2003). Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia*

- eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13075-13083.
- Brereton, P. S., Verhagen, M. F., Zhou, Z. H., & Adams, M. W. (1998). Effect of iron-sulfur cluster environment in modulating the thermodynamic properties and biological function of ferredoxin from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **37**, 7351-7362.
- Brøndsted, L., & Atlung, T. (1994). Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (hya) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5423-5428.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., & Upcroft, P. (1996). A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**, 155-161.
- Buhrke, T., Bleijlevens, B., Albracht, S. P., & Friedrich, B. (2001). Involvement of *hyp* gene products in maturation of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **183**, 7087-7093.
- Buhrke, T. (2002). Der H₂-Sensor von *Ralstonia eutropha*: Struktur-Funktions-Beziehungen einer neuartigen [NiFe]-Hydrogenase. Dissertation. Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Buhrke, T., Lenz, O., Porthun, A., & Friedrich, B. (2004). The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol. Microbiol.* **51**, 1677-1689.
- Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N., & Friedrich, B. (2005). Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J. Biol. Chem.* **280**, 23791-23796.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., & Friedrich, B. (2005a). [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 181-196.
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q. Y., Back, J. W., Hartog, A. F., Muijsers, A. O., de Koster, C. G., Albracht, S. P. J., & Friedrich, B. (2005b). The soluble NAD⁺-reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J. Bacteriol.* **187**, 3122-3132.
- Bürstel, I., Hummel, P., Siebert, E., Wisitruangsakul, N., Zebger, I., Friedrich, B., & Lenz, O. (2011). Probing the origin of the metabolic precursor of the CO ligand in the catalytic center of [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **286**, 44937-44944.
- Bürstel, I., Siebert, E., Winter, G., Hummel, P., Zebger, I., Friedrich, B., & Lenz, O. (2012). A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)₂(CO) moiety of [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **287**, 38845-38853.
- Bürstel, I. (2013). Die pleiotrope Maturation der sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*. Dissertation. Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Calzolari, L., Gorst, C. M., Zhao, Z. H., Teng, Q., Adams, M. W., & La Mar, G. N. (1995). ¹H-NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* **34**, 11373-11384.
- Cammack, R., Patil, D., Aguirre, R., & Hatchikian, E. C. (1982). Redox Properties of the ESR-Detectable Nickel in Hydrogenase from *Desulfovibrio Gigas*. *FEBS Lett.* **142**, 289-292.
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763.
- Conrad, R., & Seiler, W. (1980). Contribution of Hydrogen-Production by Biological Nitrogen-Fixation to the Global Hydrogen Budget. *J. Geophys. Res. Oc. Atm.* **85**, 5493-5498.
- Conrad, R., Aragno, M., & Seiler, W. (1983). The Inability of Hydrogen Bacteria to Utilize Atmospheric Hydrogen Is Due to Threshold and Affinity for Hydrogen. *Fems Microbiol. Lett.* **18**, 207-210.
- Constant, P., Poissant, L., & Villemur, R. (2008). Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the first microorganism demonstrating high-affinity uptake of tropospheric H₂. *ISME J.* **2**, 1066-1076.
- Constant, P., Poissant, L., & Villemur, R. (2009). Tropospheric H₂ budget and the response of its soil uptake under the changing environment. *Sci. Total Environ.* **407**, 1809-1823.

- Constant, P., Chowdhury, S. P., Pratscher, J., & Conrad, R. (2010). Streptomyces contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ. Microbiol.* **12**, 821-829.
- Constant, P., Chowdhury, S. P., Hesse, L., & Conrad, R. (2011a). Co-localization of atmospheric H₂ oxidation activity and high affinity H₂-oxidizing bacteria in non-axenic soil and sterile soil amended with *Streptomyces* sp PCB7. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1888-1893.
- Constant, P., Chowdhury, S. P., Hesse, L., Pratscher, J., & Conrad, R. (2011b). Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6027-6035.
- Cracknell, J. A., Wait, A. F., Lenz, O., Friedrich, B., & Armstrong, F. A. (2009). A kinetic and thermodynamic understanding of O₂ tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20681-20686.
- Cramm, R. (2009). Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 38-52.
- De Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., & Fernandez, V. M. (1997). Infrared spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7181-7189.
- De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., & Cammack, R. (2007). Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: Spectroelectrochemical studies. *Chem. Rev.* **107**, 4304-4330.
- Dementin, S., Belle, V., Bertrand, P., Guigliarelli, B., Adryanczyk-Perrier, G., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., & Leger, C. (2006). Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5209-5218.
- Dernedde, J., Eitinguer, T., Patenge, N., & Friedrich, B. (1996). *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur. J. Biochem.* **235**, 351-358.
- Duche, O., Elsen, S., Cournac, L., & Colbeau, A. (2005). Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS J.* **272**, 3899-3908.
- Ehhalt, D. H., & Rohrer, F. (2009). The tropospheric cycle of H₂: a critical review. *Tellus B* **61**, 500-535.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501.
- Evans, R. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Murphy, B. J., Adamson, H., Lukey, M. J., Sargent, F., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., & Armstrong, F. A. (2013). Principles of sustained enzymatic hydrogen oxidation in the presence of oxygen--the crucial influence of high potential Fe-S clusters in the electron relay of [NiFe]-hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2694-2707.
- Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., & Cammack, R. (1985). Properties and Reactivation of 2 Different Deactivated Forms of *Desulfovibrio Gigas* Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 69-79.
- Fichtner, C., Laurich, C., Bothe, E., & Lubitz, W. (2006). Spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry* **45**, 9706-9716.
- Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., & Nicolet, Y. (2007). Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev.* **107**, 4273-4303.
- Friedrich, C. G., Friedrich, B., & Bowien, B. (1981). Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism during Heterotrophic Growth of *Alcaligenes Eutrophus*. *J. Gen. Microbiol.* **122**, 69-78.
- Friedrich, C. G. (1982). Derepression of Hydrogenase during Limitation of Electron-Donors and Derepression of Ribulosebiphosphate Carboxylase during Carbon Limitation of *Alcaligenes Eutrophus*. *J. Bacteriol.* **149**, 203-210.
- Frielingsdorf, S., Schubert, T., Pohlmann, A., Lenz, O., & Friedrich, B. (2011). A trimeric supercomplex of the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry* **50**, 10836-10843.

- Fritsch, J. (2011). Molekulare Grundlagen der Sauerstofftoleranz der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16. Dissertation. Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin.
- Fritsch, J., Lenz, O., & Friedrich, B. (2011a). The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **193**, 2487-2497.
- Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., & Spahn, C. M. T. (2011b). The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* **479**, 249-252.
- Fritsch, J., Lenz, O., & Friedrich, B. (2013). Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 106-114.
- Ganskow, S. (2012). Der molekulare Mechanismus der H₂-abhängigen Signaltransduktion in *R. eutropha*. Dissertation. Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* **7**, 557-566.
- Gebler, A., Burgdorf, T., De Lacey, A. L., Rüdiger, O., Martinez-Arias, A., Lenz, O., & Friedrich, B. (2007). Impact of alterations near the [NiFe] active site on the function of the H₂-sensor from *Ralstonia eutropha*. *FEBS J.* **274**, 74-85.
- George, S. J., Armstrong, F. A., Hatchikian, E. C., & Thomson, A. J. (1989). Electrochemical and Spectroscopic Characterization of the Conversion of the 7Fe into the 8Fe-Form of Ferredoxin-III from *Desulfovibrio Africanus* - Identification of a [4Fe-4S] Cluster with One Non-Cysteine Ligand. *Biochem. J.* **264**, 275-284.
- Gogotov, I. N., Zorin, N. A., Serebriakova, L. T., & Kondratieva, E. N. (1978). Properties of Hydrogenase from *Thiocapsa-Roseopersicina*. *Biochim. Biophys. Acta* **523**, 335-343.
- Goris, T., Wait, A. F., Saggu, M., Fritsch, J., Heidary, N., Stein, M., Zebger, I., Lendzian, F., Armstrong, F. A., Friedrich, B., & Lenz, O. (2011). A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 310-318.
- Gross, R., Simon, J., Theis, F., & Kröger, A. (1998). Two membrane anchors of *Wolinella succinogenes* hydrogenase and their function in fumarate and polysulfide respiration. *Arch. Microbiol.* **170**, 50-58.
- Gruner, I., Frädrich, C., Böttger, L. H., Trautwein, A. X., Jahn, D., & Härtig, E. (2011). Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J. Biol. Chem.* **286**, 2017-2021.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P., & Bagley, K. A. (1997). Biological activation of hydrogen. *Nature* **385**, 126.
- Higuchi, Y., Yagi, T., & Yasuoka, N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**, 1671-1680.
- Horch, M., Lauterbach, L., Lenz, O., Hildebrandt, P., & Zebger, I. (2012). NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett.* **586**, 545-556.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., & Johnson, M. K. (2005). STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247-281.
- Jones, A., Lenz, O., Strack, A., Buhrke, T., & Friedrich, B. (2004). [NiFe] Hydrogenase Active Site Biosynthesis: Identification of Hyp Protein Complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry* **43**, 13467-13477.
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132.
- Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., & Friedrich, B. (2000). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J. Bacteriol.* **182**, 2716-2724.

- Knüttel, K., Schneider, K., Erkens, A., Plass, W., Müller, A., Bill, E., & Trautwein, A. X. (1994). Redox Properties of the Metal Centers in the Membrane-Bound Hydrogenase from *Alcaligenes Eutrophus* CH34. *B. Pol. Acad. Sci.-Chem.* **42**, 495-511.
- Kohlmann, Y., Pohlmann, A., Otto, A., Becher, D., Cramm, R., Lütte, S., Schwartz, E., Hecker, M., & Friedrich, B. (2011). Analyses of soluble and membrane proteomes of *Ralstonia eutropha* H16 reveal major changes in the protein complement in adaptation to lithoautotrophy. *J. Proteome Res.* **10**, 2767-2776.
- Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11643-11691.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafavre, J. S., & Focht, D. D. (1983). Conservation in Soil of H₂ Liberated from N₂ Fixation by Hup-Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 304-311.
- Lauterbach, L., Idris, Z., Vincent, K. A., & Lenz, O. (2011a). Catalytic properties of the isolated diaphorase fragment of the NAD-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *PLoS One* **6**, e25939.
- Lauterbach, L., Liu, J. A., Horch, M., Hummel, P., Schwarze, A., Haumann, M., Vincent, K. A., Lenz, O., & Zebger, I. (2011b). The Hydrogenase Subcomplex of the NAD⁺-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* - Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **7**, 1067-1079.
- Lauterbach, L. (2013). Die Analyse der Sauerstofftoleranz und biotechnologische Anwendung der NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16. Dissertation. Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lauterbach, L., & Lenz, O. (2013). Catalytic production of hydrogen peroxide and water by oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase during H cycling in the presence of O. *J. Am. Chem. Soc.* DOI: 10.1021/ja408420d.
- Lauterbach, L., Lenz, O., & Vincent, K. A. (2013). H₂ -driven cofactor regeneration using NAD(P)⁺ -reducing hydrogenases. *FEBS J.* **280**, 3058-3068.
- Lenz, O., Schwartz, E., Darnedde, J., Eitinger, M., & Friedrich, B. (1994). The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* Gene Participates in Hydrogenase Regulation. *J. Bacteriol.* **176**, 4385-4393.
- Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A., & Friedrich, B. (1997). A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. *J. Bacteriol.* **179**, 1655-1663.
- Lenz, O., & Friedrich, B. (1998). A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12474-12479.
- Lenz, O., Gleiche, A., Strack, A., & Friedrich, B. (2005). Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Bacteriol.* **187**, 6590-6595.
- Lenz, O., Ludwig, M., Schubert, T., Büstel, I., Ganskow, S., Goris, T., Schwarze, A., & Friedrich, B. (2010). H₂ Conversion in the Presence of O₂ as Performed by the Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Chemphyschem* **11**, 1107-1119.
- Leul, M., Normand, P., & Sellstedt, A. (2007). The organization, regulation and phylogeny of uptake hydrogenase genes in Frankia. *Physiol. Plantarum* **130**, 464-470.
- Liochev, S., Hausladen, A., Beyer, W., & Fridovich, I. (1994). NADPH:ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1328-1331.
- Ludwig, M., Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Armstrong, F. A., & Lenz, O. (2009a). Oxygen-tolerant H₂ oxidation by membrane-bound [NiFe] hydrogenases of *Ralstonia* species: Coping with low level H₂ in air. *J. Biol. Chem.* **284**, 465-477.
- Ludwig, M., Schubert, T., Zebger, I., Wisitruangsakul, N., Saggu, M., Strack, A., Lenz, O., Hildebrandt, P., & Friedrich, B. (2009b). Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **284**, 2159-2168.

- Lukey, M. J., Roessler, M. M., Parkin, A., Evans, R. M., Davies, R. A., Lenz, O., Friedrich, B., Sargent, F., & Armstrong, F. A. (2011). Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases: the individual and collective importance of supernumerary cysteines at the proximal Fe-S cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16881-16892.
- Lütte, S. (2007). Untersuchungen zur Genexpression terminaler Oxidasen in *R. eutropha* H16. Studienjahresarbeit. Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lütte, S. (2009). Untersuchungen zur Genexpression terminaler Oxidoreduktasen in *Ralstonia eutropha* H16. Diplomarbeit. Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin.
- Manodori, A., Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R. P., Werth, M. T., & Johnson, M. K. (1992). [3Fe-4S] to [4Fe-4S] Cluster Conversion in *Escherichia coli* Fumarate Reductase by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **31**, 2703-2712.
- Marques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A. C., & Matias, P. M. (2010). The Three-Dimensional Structure of [NiFeSe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: A Hydrogenase without a Bridging Ligand in the Active Site in Its Oxidised, "as-Isolated" State. *J. Mol. Biol.* **396**, 893-907.
- Marques, M. C., Coelho, R., Pereira, I. A. C., & Matias, P. M. (2013). Redox state-dependent changes in the crystal structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Int. J. Hydrogen Energ.* **38**, 8664-8682.
- Marx, C. J., & Lidstrom, M. E. (2001). Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **147**, 2065-2075.
- Massanz, C., Fernandez, V. M., & Friedrich, B. (1997). C-terminal extension of the H₂-activating subunit, HoxH, directs maturation of the NAD-reducing hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* **245**, 441-448.
- Matias, P. M., Soares, C. M., Saraiva, L. M., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J., & Carrondo, M. A. (2001). [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: Gene Sequencing, Three-dimensional Structure Determination and Refinement at 1.8 Angstrom and Modelling Studies of its Interaction with the Tetrahaem Cytochrome *c*₃. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 63-81.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674.
- Mills, D. J., Vitt, S., Strauss, M., Shima, S., & Vonck, J. (2013). De novo modeling of the F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase from a methanogenic archaeon by cryo-electron microscopy. *eLife* **2**, e00218.
- Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., & Mäntele, W. (1990). Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome *c*. *Eur. J. Biochem.* **187**, 565-572.
- Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Förster, R., Hellmig, M., Paithankar, K. S., Puhlinger, S., Steffien, M., Zocher, G., & Weiss, M. S. (2012). Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 442-449.
- Mulder, D. W., Shepard, E. M., Meuser, J. E., Joshi, N., King, P. W., Posewitz, M. C., Broderick, J. B., & Peters, J. W. (2011). Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Structure* **19**, 1038-1052.
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., & Fujita, Y. (2010). X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**, 110-114.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Struct. Fold. Des.* **7**, 13-23.
- Niraula, N. P., Shrestha, P., Oh, T. J., & Sohng, J. K. (2010). Identification and characterization of a NADH oxidoreductase involved in phenylacetic acid degradation pathway from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol. Res.* **165**, 649-656.
- Novelli, P. C., Lang, P. M., Masarie, K. A., Hurst, D. F., Myers, R., & Elkins, J. W. (1999). Molecular hydrogen in the troposphere: Global distribution and budget. *J. Geophys. Res. Atmos.* **104**, 30427-30444.

- Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2009). [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans.* **37**, 7577-7587.
- Ogata, H., Kellers, P., & Lubitz, W. (2010). The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state). *J. Mol. Biol.* **402**, 428-444.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., & Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52.
- Palmer, T., & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 483-496.
- Pandelia, M. E., Ogata, H., & Lubitz, W. (2010). Intermediates in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase: Functional Spectroscopy of the Active Site. *Chemphyschem* **11**, 1127-1140.
- Pandelia, M. E., Nitschke, W., Infossi, P., Giudici-Orticoni, M. T., Bill, E., & Lubitz, W. (2011). Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6097-6102.
- Pandelia, M. E., Lubitz, W., & Nitschke, W. (2012). Evolution and diversification of Group 1 [NiFe] hydrogenases. Is there a phylogenetic marker for O₂-tolerance? *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1565-1575.
- Pershad, H. R., Duff, J. L., Heering, H. A., Duin, E. C., Albracht, S. P., & Armstrong, F. A. (1999). Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H⁺/H₂ value. *Biochemistry* **38**, 8992-8999.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., & Seefeldt, L. C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom resolution. *Science* **282**, 1853-1858.
- Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B., & Albracht, S. P. (1998). Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*. *FEBS Lett.* **438**, 231-235.
- Pinske, C., Jaroschinsky, M., Sargent, F., & Sawers, G. (2012a). Zymographic differentiation of [NiFe]-Hydrogenases 1, 2 and 3 of *Escherichia coli* K-12. *Bmc Microbiol.* **12**, 134.
- Pinske, C., McDowall, J. S., Sargent, F., & Sawers, R. G. (2012b). Analysis of hydrogenase 1 levels reveals an intimate link between carbon and hydrogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **158**, 856-868.
- Podzuweit, H. G., Arp, D. J., Schlegel, H. G., & Schneider, K. (1986). Investigation of the H₂-oxidizing activities of *Alcaligenes eutrophus* H16 membranes with artificial electron acceptors, respiratory inhibitors and redox-spectroscopic procedures. *Biochimie* **68**, 103-111.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1257-1262.
- Porthun, A., Bernhard, M., & Friedrich, B. (2002). Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* **177**, 159-166.
- Py, B., & Barras, F. (2010). Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 436-446.
- Reijerse, E., Lendzian, F., Isaacson, R., & Lubitz, W. (2012). A tunable general purpose Q-band resonator for CW and pulse EPR/ENDOR experiments with large sample access and optical excitation. *J. Magn. Reson.* **214**, 237-243.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S., & Böck, A. (2003). Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299**, 1067-1070.
- Rey, L., Fernandez, D., Brito, B., Hernando, Y., Palacios, J. M., Imperial, J., & Ruiz-Argueso, T. (1996). The hydrogenase gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae contains an additional gene (hypX), which encodes a protein with sequence similarity to the N10-

- formyltetrahydrofolate-dependent enzyme family and is required for nickel-dependent hydrogenase processing and activity. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 237-248.
- Riethausen, J., Rüdiger, O., Gärtner, W., Lubitz, W., & Shafaat, H. S. (2013). Spectroscopic and electrochemical characterization of the [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: reversible redox behavior and interactions between electron transfer centers. *Chembiochem* **14**, 1714-1719.
- Rippers, Y., Horch, M., Hildebrandt, P., Zebger, I., & Mrogiński, M. A. (2012). Revealing the absolute configuration of the CO and CN⁻ ligands at the active site of a [NiFe] hydrogenase. *Chemphyschem* **13**, 3852-3856.
- Roberts, L. M., & Lindahl, P. A. (1994). Analysis of oxidative titrations of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase; implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* **33**, 14339-14350.
- Roessler, M. M., Evans, R. M., Davies, R. A., Harmer, J., & Armstrong, F. A. (2012). EPR Spectroscopic Studies of the Fe-S Clusters in the O₂-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase Hyd-1 from *Escherichia coli* and Characterization of the Unique [4Fe-3S] Cluster by HYSCORE. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15581-15594.
- Roessler, M. M., Evans, R. M., Davies, R. A., Harmer, J., & Armstrong, F. A. (2013). EPR Spectroscopic Studies of the Fe-S Clusters in the O₂-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase Hyd-1 from *Escherichia coli* and Characterization of the Unique [4Fe-3S] Cluster by HYSCORE (vol 134, pg 15581, 2012). *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4159-4159.
- Römermann, D., Warrelmann, J., Bender, R. A., & Friedrich, B. (1989). An *rpoN*-like gene of *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas facilis* controls expression of diverse metabolic pathways, including hydrogen oxidation. *J. Bacteriol.* **171**, 1093-1099.
- Roncaroli, F., Pandelia, M., Bill, E., Friedrich, B., Lenz, O., & Lubitz, W. (in Preparation). The regulatory [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* studied by Mössbauer and pulse EPR spectroscopy. *In Preparation*
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. C., & Hatchikian, E. C. (1998). [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11625-11630.
- Saggu, M., Zebger, I., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., Hildebrandt, P., & Lendzian, F. (2009). Spectroscopic insights into the oxygen-tolerant membrane-associated [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biol. Chem.* **284**, 16264-16276.
- Sawers, R. G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 42-46.
- Schink, B., & Schlegel, H. G. (1978). Mutants of *Alcaligenes eutrophus* defective in autotrophic metabolism. *Arch. Microbiol.* **117**, 123-129.
- Schink, B., & Schlegel, H. G. (1979). The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **567**, 315-324.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R., & Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.
- Schmidt, U. (1974). Molecular Hydrogen in Atmosphere. *Tellus* **26**, 78-90.
- Schneider, K., & Schlegel, H. G. (1976). Purification and Properties of Soluble Hydrogenase from *Alcaligenes Eutrophus* H 16. *Biochim. Biophys. Acta* **452**, 66-80.
- Schneider, K., & Schlegel, H. G. (1981). Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem. J.* **193**, 99-107.
- Schneider, K., Schlegel, H. G., & Jochim, K. (1984). Effect of Nickel on Activity and Subunit Composition of Purified Hydrogenase from *Nocardia Opaca* 1b. *Eur. J. Biochem.* **138**, 533-541.
- Schreiner, M. E., & Eikmanns, B. J. (2005). Pyruvate : Quinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*: Purification and biochemical characterization. *J. Bacteriol.* **187**, 862-871.
- Schubert, T., Lenz, O., Krause, E., Volkmer, R., & Friedrich, B. (2007). Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol. Microbiol.* **66**, 453-467.

- Schuler, S., & Conrad, R. (1991). Hydrogen Oxidation Activities in Soil as Influenced by Ph, Temperature, Moisture, and Season. *Biol. Fert. Soils* **12**, 127-130.
- Schwartz, E., Gerischer, U., & Friedrich, B. (1998). Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J. Bacteriol.* **180**, 3197-3204.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitinger, T., Friedrich, B., & Gottschalk, G. (2003). Complete Nucleotide Sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 Megaplasmid Encoding Key Enzymes of H₂-based Lithoautotrophy and Anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* **332**, 369-383.
- Schwartz, E., Fritsch, J., & Friedrich, B. (2013). H₂-Metabolizing Prokaryotes. in *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* (Hrsg.: Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F.), 4. Ed., Springer Berlin/Heidelberg. pp 119-199.
- Shafaat, H. S., Rüdiger, O., Ogata, H., & Lubitz, W. (2013). [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *Bba-Bioenergetics* **1827**, 986-1002.
- Sham, S., Calzolari, L., Wang, P. L., Bren, K., Haarklau, H., Brereton, P. S., Adams, M. W., & La Mar, G. N. (2002). A solution NMR molecular model for the aspartate-ligated, cubane cluster containing ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **41**, 12498-12508.
- Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H., & Higuchi, Y. (2011). Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature* **479**, 253-256.
- Siegbahn, P. E., Tye, J. W., & Hall, M. B. (2007). Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases. *Chem. Rev.* **107**, 4414-4435.
- Silakov, A., Wenk, B., Reijerse, E., & Lubitz, W. (2009). ¹⁴N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 6592-6599.
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for Invivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technol.* **1**, 784-791.
- Skerra, A., & Schmidt, T. G. (2000). Use of the *Strep*-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gärtner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Srisawat, C., & Engelke, D. R. (2001). Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* **7**, 632-641.
- Steinbüchel, A., & Schlegel, H. G. (1991). Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**, 535-542.
- Tamagnini, P., Leitao, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D. J., Heidorn, T., & Lindblad, P. (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *Fems Microbiol. Rev.* **31**, 692-720.
- Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Moura, J. J. G., Legall, J., Dervartanian, D. V., Peck, H. D., & Huynh, B. H. (1989). Redox Intermediates of *Desulfovibrio Gigas* [NiFe] Hydrogenase generated under Hydrogen - Mossbauer and EPR Characterization of the Metal Centers. *J. Biol. Chem.* **264**, 16435-16450.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., & Shima, S. (2010). Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 507-536.
- van der Linden, E., Faber, B. W., Bleijlevens, B., Burgdorf, T., Bernhard, M., Friedrich, B., & Albracht, S. P. (2004). Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 801-808.
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2285-2289.
- Vignais, P. M., Dimon, B., Zorin, N. A., Colbeau, A., & Elsen, S. (1997). HupUV proteins of *Rhodobacter capsulatus* can bind H₂: evidence from the H-D exchange reaction. *J. Bacteriol.* **179**, 290-292.

- Vignais, P. M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *Fems Microbiol. Rev.* **25**, 455-501.
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chem. Rev.* **107**, 4206-4272.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B., & Armstrong, F. A. (2005). Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16951-16954.
- Vincent, K. A., Parkin, A., & Armstrong, F. A. (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem. Rev.* **107**, 4366-4413.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587.
- Volbeda, A., Montet, Y., Vernede, X., Hatchikian, E. C., & Fontecilla-Camps, J. C. (2002). High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *Int. J. Hydrogen Energ.* **27**, 1449-1461.
- Volbeda, A., Amara, P., Darnault, C., Mouesca, J. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Armstrong, F. A., & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5305-5310.
- Volbeda, A., Amara, P., Iannello, M., De Lacey, A. L., Cavazza, C., & Fontecilla-Camps, J. C. (2013a). Structural foundations for the O₂ resistance of *Desulfomicrobium baculatum* [NiFeSe]-hydrogenase. *Chem. Commun. (Camb)* **49**, 7061-7063.
- Volbeda, A., Darnault, C., Parkin, A., Sargent, F., Armstrong, F. A., & Fontecilla-Camps, J. C. (2013b). Crystal structure of the O₂-tolerant membrane-bound hydrogenase 1 from *Escherichia coli* in complex with its cognate cytochrome *b*. *Structure* **21**, 184-190.
- Voss, S., & Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**, 975-982.
- Wait, A. F., Parkin, A., Morley, G. M., dos Santos, L., & Armstrong, F. A. (2010). Characteristics of Enzyme-Based Hydrogen Fuel Cells Using an Oxygen-Tolerant Hydrogenase as the Anodic Catalyst. *J Phys Chem C* **114**, 12003-12009.
- Walker, S. C., Scott, F. H., Srisawat, C., & Engelke, D. R. (2008). RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. *Methods Mol. Biol.* **488**, 23-40.
- Wang, R., Healey, F. P., & Myers, J. (1971). Amperometric Measurement of Hydrogen Evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **48**, 108-112.
- Wilde, E. (1962). Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Archiv. Mikrobiol.* **43**, 109-137.
- Wilson, S. T., Tozzi, S., Foster, R. A., Ilikchyan, I., Kolber, Z. S., Zehr, J. P., & Karl, D. M. (2010). Hydrogen Cycling by the Unicellular Marine Diazotroph *Crocospaera watsonii* Strain WH8501. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6797-6803.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D-Biol. Crystallogr.* **67**, 235-242.
- Wolf, I., Buhrke, T., Dornedde, J., Pohlmann, A., & Friedrich, B. (1998). Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Microbiol.* **170**, 451-459.
- Yanai, I., Mellor, J. C., & DeLisi, C. (2002). Identifying functional links between genes using conserved chromosomal proximity. *Trends Genet.* **18**, 176-179.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich und Herrn Dr. Oliver Lenz herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Dr. Stefan Frielingsdorf danke ich für seine ständige Bereitschaft, Fragen zu diskutieren und für seine überaus hilfreichen Lösungsvorschläge für Probleme aller Art.

Mein herzlicher Dank gilt den Kooperationspartnern meines Promotionsprojektes, nämlich Sandra Hennig, Dr. Martin Bommer, Dr. Jae-Hun Jeoung und Prof. Dr. Holger Dobbek aus der Arbeitsgruppe für Strukturbioogie/Biochemie der Humboldt-Universität Berlin sowie Dr. Olaf Rüdiger, Dr. Federico Roncaroli und Prof. Dr. Wolfgang Lubitz vom Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim/Ruhr.

Weiterhin danke ich Angelika Strack, Josta Hamann und Janna Schoknecht für ihre Unterstützung in Fragen des Laboralltags. Angelia Strack danke ich darüber hinaus für die gelegentliche Unterstützung bei Experimenten. Dr. Anne Pohlmann danke ich für die Einführung in die RT-qPCR.

Allen meinen Kollegen und Freunden im Labor möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Dr. Johannes Fritsch und Dr. Lars Lauterbach für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen. Katja Karstens, Franziska Kirsch, Dr. Stefanie Ganskow, Steffen Lütte, Dr. Olivia Neubauer und Sven Hörnig danke ich zudem für abwechslungsreiche Labortage und zahlreiche Aktivitäten außerhalb des Labors.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Caspar Schäfer
